



Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental
Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia – CIBEBI

ASSOCIAÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM TUBERCULOSE PULMONAR

TAJIANA COSTA DA SILVA

Porto Velho/RO
Março de 2010

TAJIANA COSTA DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM TUBERCULOSE PULMONAR

Reitor: José Januário de Oliveira Amaral

Diretora do NUSAU: Ana Lucia Escobar

Coordenador do Programa: Vera Engracia G. Oliveira

TAJIANA COSTA DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM TUBERCULOSE PULMONAR

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental, com ênfase em Genética. Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia - CIBEBI, 2010.

Orientadora: Profª Drª Rubiani de Cássia Pagotto

Porto Velho/RO
Março de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA
Biblioteca Central Prof. Roberto Duarte Pires

Silva, Tajiana Costa da.

S586a

Associação da Alfa-1-Antitripsina com Tuberculose Pulmonar /
Tajiana Costa da Silva. Porto Velho, Rondônia, 2010.

79f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) -
Departamento de Biologia, Núcleo de Ciências e Tecnologia,
Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho,
Rondônia, 2010.

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB 11-549

TAJIANA COSTA DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM TUBERCULOSE PULMONAR

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental, ênfase em Genética. Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia - CIBEBI, 2010.

Aprovado em _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Rubiani de Cassia Pagotto
Universidade Federal de Rondônia-UNIR

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Maria Manuela F. Moura
Universidade Federal de Rondônia-UNIR.

Assinatura: _____

Prof. Dr^o. Ricardo G.M.Ferreira.
Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais-IPEPATRO.

Assinatura: _____

Dedicatória

Ao meu marido Nei Eduardo e ao meu filho Gabriel por me darem forças quando por inúmeras vezes pensei em fraquejar, pela compreensão frente aos meus problemas e cansaço, bem como minha ausência. Enfim, pelo amor, dedicação e incentivos constantes.

Homenagem Especial

A minha orientadora, Dr^a Rubiani de Cássia Pagotto, pelo apoio, incentivos por crer em mim e respeitar minhas limitações por me ensinar e compartilhar um conhecimento que levarei comigo para sempre. Conhecimento este que vai além de ensinar, dividindo experiências da vida, tornando-nos assim, mais que orientadora e orientando, mas amigas.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus por me proteger durante minha vida, dando-me fé para ultrapassar todas as etapas difíceis.

A Dr.^a Ana Lúcia Escobar, pela oportunidade inicial de meu ingresso no mestrado como primeira orientadora, sendo uma pessoa tão capaz, persistente e confiante diante de sua profissão.

A Dr.^a Maria Manuela, diretora geral do CIBEBI, pela amizade de longa data, bem como apoio físico e estrutural dos laboratórios.

Ao Dr. Ricardo G.M. Ferreira, pela disponibilidade e atenção dispensada a minha pessoa e pelas inúmeras contribuições ao presente trabalho.

A Dr.^a Vera Engracia, coordenadora do PGBCOP, pelas valiosas contribuições ao trabalho e por todo apoio recebido.

Ao Prof.^o Dr.^o Juan Miguel V. Salcedo, pela disponibilidade, paciência e importantes sugestões aferidas ao meu trabalho quando solicitado.

Ao médico Prof.^o José Carlos Coutinho de Oliveira, pelo apoio frente ao atendimento dos pacientes e carinho dispensados.

Aos estudantes de medicina Sr. Jimmy Pauly Garater e Sr. Douglas Paschoal dos Santos, pela amizade estabelecida e paciência nos finais de semana dedicados as coletas e atendimentos aos pacientes.

A todos os colegas de laboratório, principalmente ao Biólogo Allison Carlos A. Silva, pelas inúmeras socorros prestados e parceria incomparável.

Ao estimado amigo Sr. Leandro Jordani, pela presença imprescindível nos dias de coleta.

A todas as unidades de saúde contatadas e seus chefes responsáveis pelos setores de Tuberculose, pela disponibilidade de espaço físico e pronto atendimento.

Aos responsáveis gerais e a equipe de funcionários do Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental, pelo trabalho e esforço designados ao auxílio deste mestrado.

A todos os pacientes que tive contato, que fiquei conhecendo um pouco da história e do sofrimento frente à doença e aos obstáculos da vida, sem deixar de destacar aos que mesmo no decorrer de minha pesquisa tive o desprazer de saber de seus óbitos.

A Fundação Universidade Federal de Rondônia, pelo espaço físico.

À CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

*A todos os que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho,
que apesar das intempéries me fez feliz e capaz de realizar algo.*

*"Longa é a viagem rumo a si próprio. Inesperada é a
sua descoberta."*

Thomas Mann

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO.....	18
1. ALFA-1-ANTITRIPSINA	18
1.1 O GENE DA ALFA-1-ANTITRIPSINA	19
1.2 PRINCIPAIS MUTAÇÕES DO GENE DA ALFA-1-ANTITRIPSINA	23
1.3 MUTAÇÃO Z.....	24
1.4 MUTAÇÃO S	24
1. 5. DEFICIÊNCIA DA ALFA-1-ANTITRIPSINA.....	25
2. MICOBACTÉRIAS - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	26
2.1 PATOGENICIDADE	27
2.2 DISSEMINAÇÃO	29
3.TUBERCULOSE	30
3.1. TUBERCULOSE PULMONAR.....	34
3.2 TRATAMENTO.....	34
3.3 MECANISMOS IMUNITÁRIOS DA TB.....	35
4. OBJETIVOS	38
4.1. Geral:	38
4.2. Específicos:	38
5. METODOLOGIA	39
5.1. Material e Métodos.....	39
6. RESULTADOS	45
7. DISCUSSÃO	51
7.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS BÁSICOS.....	51
7.2. ANÁLISE GENÉTICA	52
8. CONCLUSÕES.....	55

REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS	65
1- CARTA CONVITE AOS PACIENTES	66
2 - QUESTIONÁRIO	67
3 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	69
4 - APROVAÇÕES DOS DIRETORES USBs PORTO VELHO.....	70
APÊNDICES	76
SOLUÇÕES E REAGENTES	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do gene da A1AT (PI), gene da alfa-1-antiquimiotripsina (AACT), do inibidor da proteína C (PCI), pseudogene da A1AT (PIL)	18
Figura 2: Organização genômica do gene da A1AT	19
Figura 3: Árvore filogenética do gene da A1AT	20
Figura 4: Colônias de Mycobacterium tuberculosis	28
Figura 5: Incidência de tuberculose segundo Ministério da Saúde, 2007	31
Figura 6: Gel de poliacrilamida 6% in natura corado com nitrato de prata.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Dados do Ministério da Saúde quanto a percentagem das formas de TB no Brasil, no ano de 2007.....	32
Gráfico 2: Dados do Ministério da Saúde quanto a percentagem das formas de TB Extrapulmonar no Brasil, no ano de 2007.....	32
Gráfico 3: Análise quanto a informação do tipo de TB, dos pacientes atendidos nas Unidades Básicas de Saúde, no município de Porto Velho/RO.....	45
Gráfico 4: Pirâmide etária, subdividida por sexo, na amostra de pacientes com tuberculose na cidade de Porto Velho (RO).....	46
Gráfico 5: Etnia declarada pelos pacientes com tuberculose em uma amostragem realizada na cidade de Porto Velho (RO).....	46
Gráfico 6: Relação da escolaridade dos pacientes TB positivos, participantes na etapa da coletas de material biológico.....	47
Gráfico 7: Tempo de uso de medicamentos durante o tratamento de Tuberculose, em uma amostragem realizada em Porto Velho (RO).....	47
Gráfico 8: Diagnóstico no tratamento final dos pacientes com tuberculose amostrados na cidade de Porto Velho (RO).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequências dos alelos do sistema PI em diversas populações do Globo.....	21
Tabela 2: Mostra a relação dos principais fenótipos da alfa-1-antitripsina e seus níveis séricos.....	22
Tabela 3: Apresentação das frequências alélicas estimadas dos genótipos de alfa-1-antitripsina em uma amostra de pacientes com Tuberculose.....	49
Tabela 4: Frequências gênicas para o sistema PI na população geral* e em pacientes com TB pulmonar do município de Porto Velho (RO).....	49

LISTA DE SIGLAS

A1AT- alfa-1-antitripsina

CD - Células T elaborados no timo (CD4 e CD8)

CEP - Conselho de ética em pesquisa

CIBEBI - Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia

DA1AT- deficiência de alfa-1-antitripsina

Dp- Desvio padrão

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EDTA-ácido etilenodiaminotetracético

EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

EN - Elastase Neutrófila

G6PD - Glucose-6-fosfato-desidrogenase

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA - Antígeno Leucocítico Humano

ICAM - Cytokine-induced

IFN γ - Interferon gama

IL - interleucinas

Kb - Quilobases

KDa - QuiloDalton

M- Micobacterium

NACl - Cloreto de Sódio

NRAMP - Proteína macrofágica associada à resistência natural

NUSAU - Núcleo de Saúde

PA - Isopropanol

PAS - ácido para-amino-salicílico

Pb - pares de bases

PCR- reação em cadeia da polimerase

PI - Sistema Inibidor de protease

PI*M - alelo M do sistema Inibidor de protease

PI*S - alelo S do sistema Inibidor de protease

PI*Z - alelo Z do sistema Inibidor de protease

PNB - P-nitrobenzoato

PPD - Purified Protein Derivate

RFA - Resposta de fase aguda

SINAN - Sistema Nacional agravos e notificações

SNPs - Polimorfismo de Base Única

Taq - Enzima de restrição Taq polimerase

TB – Tuberculose

TBE - tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,6

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF - Fator de necrose tumoral

TRIS- Tris-hidroxometilaminometano

UBS - Unidade Básica de Saúde

VDR - Receptor de vitamina D

RESUMO

SILVA, T. C.; **ASSOCIAÇÃO DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM TUBERCULOSE PULMONAR**. Porto Velho/RO, 2010. Mestrado em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia.

A deficiência da Alfa-1-Antitripsina (DAAT, DA1AT) é uma doença de origem genética que tem diversas implicações quanto ao aumento do risco de desenvolvimento de uma variedade de patologias, afetando especialmente pulmões e fígado. Em relação à tuberculose poucos trabalhos relacionam esta doença a proteínas reativas de fase aguda como A1AT, proteína cujo aumento significativo dos níveis séricos foi identificado em pacientes com TB, porém sem nenhuma referência ao polimorfismo da mesma. No presente trabalho foi investigada, a partir de uma verificação de prontuários de pacientes com TB positivos atendidos nas Unidades Básicas de Saúde de Porto Velho (RO) nos anos de 2007 a 2008, o perfil epidemiológico da doença no referido município e a ocorrência dos principais alelos determinantes da DAAT em uma amostra de pacientes. Foram analisados inicialmente 227 prontuários, cuja idade média dos pacientes foi de 35,4 anos ($dp=16,35$), sendo 37,4% dos pacientes atendidos nos períodos de avaliação, do sexo feminino. Foram identificadas falhas nos registros desta doença, sendo observados prontuários incompletos com ausência de informações pessoais, resultados de exames básicos de TB, teste de HIV, bem como as informações clínicas do quadro atual do paciente. A genotipagem molecular para os alelos PI*S e PI*Z da A1AT ($n=66$) possibilitou a estimativa das frequências de PI*S e PI*Z, respectivamente, de 0,0379 e 0,0227. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências observadas e as esperadas segundo a Lei de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,2072$; $dp=0,0059$). O cálculo do risco relativo de desenvolver TB entre os pacientes e indivíduos da população de Porto Velho não foi estatisticamente significativo ($p=0,448$), indicando a necessidade de maiores estudos para que se possa concluir com segurança em relação à associação dos alelos PI e a suscetibilidade a TB.

ABSTRACT

SILVA, T. C.; ALPHA-1-ANTITRYPSIN ASSOCIATION IN LUNG TUBERCULOSIS.

Porto Velho/RO, 2010. Master Degree in Experimental Biology, Federal University of Rondônia.

The Alpha-1-antitrypsin deficiency (DAAT, DA1AT) is genetic illness that has some implications about the increase of the risk to development of pathologies, mainly lung and liver. There are, in literature, a few results about tuberculosis and the acute phase reactive proteins, as alpha-1-antitrypsin (A1AT). This protein had a significant increase of the serum levels in TB's patients, but without reference to these polymorphisms. In this work we investigated, from a profile TB patient's epidemiology, the occurrence of the main determinative alleles of the DAAT. 227 records, whose age average had been analyzed initially was 35,4 years (dp= 16,35), being 37.4% of the patients belong to the feminine sex. Imperfections in the recorders of these illness patients had been identified. There was observed records with absence of personal information, results of basic examinations of TB, HIV test, as well as the clinical information of the patient's current picture. The molecular genotyping of alleles PI*S and PI*Z by A1AT (n=66) made possible the estimate of the frequencies of PI*S and PI*Z, respectively, 0,0379 and 0,0227. We did not found statistical significant difference between the observed frequencies and the foreseen by the Law of Hardy-Weinberg Balance ($p= 0,2072$; $dp= 0,0059$). The relative risk to develop TB was not statistical significant ($p=0,448$), showing the necessity of the others researches to conclude about the association of alleles of PI and the susceptibility the TB.

INTRODUÇÃO

1. ALFA-1-ANTITRIPSINA

Correlacionando os inibidores de proteases, a alfa-1-antitripsina (A1AT¹, AAT), é uma glicoproteína de fase aguda de infecção, com peso molecular de 52 KDa. Possui 394 aminoácidos (LOMAS e PARFREY, 2004), e três resíduos de Asparagina (Asn46, Asn 83, Asn 247) ligados a carboidratos (LOEBERMANN *et al*, 1984). É sintetizada no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, secretada no plasma com concentração de 1.9-3.5mg/mL (LOMAS e PARFREY, 2004), e constitui em média 80 a 90 % dos níveis séricos da fração alfa-1-globulina (A-1G) (SILVA *et al*, 2001).

Recebe este nome por convenção, pois além de inibir a ação de várias enzimas como elastase de neutrófilos, elastase pancreática, quimiotripsina, tripsina, catepsina de macrófagos, collagenases, catepsina G, trombina, plasminogênio, entre outras, também forma complexos dissociáveis com proteases, excretadas através do catabolismo hepático, dentre essas variações também é denominada como alfa-1-antiprotease (COX, 1994).

Seus níveis séricos podem estar aumentados em ocasiões reativas à inflamações (VIDAL *et al*, 2006), devido ao fato de que, normalmente ela encontra-se atuante no soro, em líquidos teciduais e macrófagos, inibindo várias proteases que são secretadas por neutrófilos durante a inflamação. Os neutrófilos geralmente são sintetizados em capilares periféricos dos pulmões, acarretando acesso aos espaços alveolares. Quando existe o crescimento do número de leucócitos - neutrófilos macrófagos no pulmão, aumenta-se a atividade de elastases, conseqüentemente, se houver níveis inferiores de alfa-1-antitripsina, ocorrerá a destruição do tecido elástico (RUFINO E LAPA, 2006).

A A1AT tem um efeito inibitório maior sobre a elastase neutrofílica (EN), que é uma enzima de 29 KDa, produzida por células precursoras da medula óssea, e armazenadas nos neutrófilos. A EN contribui na origem de várias pneumopatias, degradando a elastina, bem como outros componentes importantes da matriz do tecido conjuntivo (BIETH, 1986).

¹ Mais importante das serinas proteases, sendo uma das poucas enzimas capazes de degradar fibras elásticas, responsáveis pelo recolhimento elástico dos tecidos, principalmente dos pulmões (CRYSTAL *et al* , 1989).

1.1 O GENE DA ALFA-1-ANTITRIPSINA

O gene da A1AT (14q31.32), também conhecido por gene SERPINA1, *locus* PI, pertence a um cluster gênico (FIGURA 1) que inclui, dentre outros, os *loci* da antiquimiotripsina e do pseudogene A1-AT (PI*L). Este complexo gênico localiza-se a 280 quiloBases (Kb) do lócus da imunoglobulina (14q32.33) (BARKER *et al*, 1997). É formado por um segmento de DNA de 12, 2 Kb (FIGURA 2), constituído por sete éxons (I_A, I_B, I_C, II a V) e seis íntrons (BILLINGSLEY *et al*, 1993).

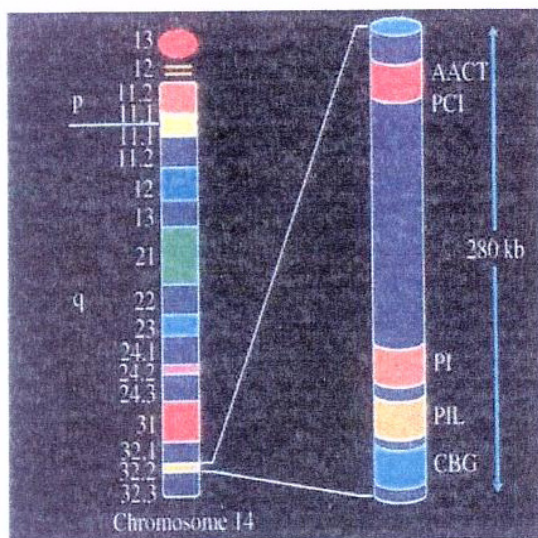


Figura 1: Está demonstrando dentro de um grupo de genes de 280 Kb, a localização do gene da A1AT (PI), gene da alfa-1-antiquimiotripsina (AACT), do inibidor da proteína C (PCI), pseudogene da A1AT (PIL), da globulina de ligação ao corticosteróide.

Fonte: (LEE & BRANTLY, 2000).

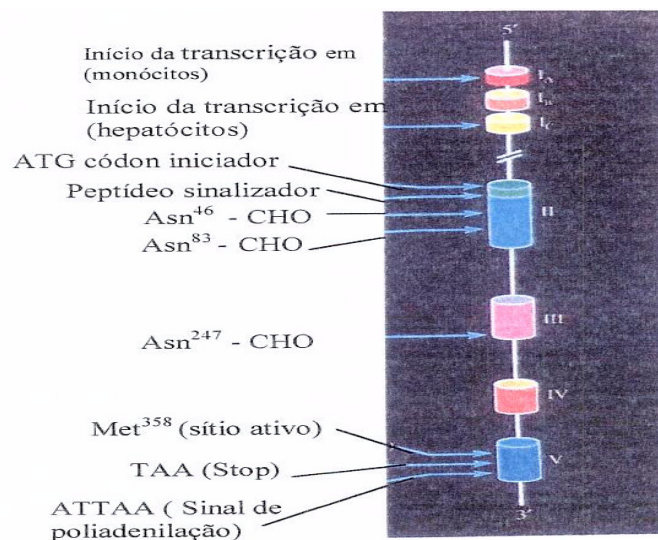


Figura 2: Explana a organização genômica do gene da A1AT, aonde os éxons IA, IB e IC não codificam a proteína, possui sequências do mRNA da proteína, mas toda a informação estrutural é codificada pelos éxons (II, III, IV e V). As asparaginas estão ligadas aos carboidratos, e são codificadas nos éxons II e III. Na posição metionina 358, encontramos o sítio ativo da proteína, codificado no éxon V. E no éxon II ocorre a inicialização da tradução.

Fonte: (LEE & BRANTLY, 2000).

O éxon I não é codificado, sendo que I_A e I_B possuem os elementos responsáveis pela transcrição macrófago-específico, enquanto o I_C , contém o promotor para a transcrição em hepatócitos. A região codificante inclui 1434 pb dispersas nos outros quatro éxons restantes. O sítio de inicialização e três sítios de glicosilação estão localizados no éxon II. No éxon III encontram-se outros três sítios de glicosilação e os sítios polimórficos mais comuns da proteína. No éxon V encontram-se o sítio ativo 358 (Met^{358} - SER^{359}), o sítio de finalização e o sítio de poliadenilação (BARKER *et al*, 1997; LUISETTI & SEERSHOLM, 2004).

Embora o principal sítio de síntese da A1AT sejam as células parenquimais do fígado, sua síntese também ocorre nos fagócitos mononucleares, neutrófilos, etc. O mRNA produzido nos hepatócitos possui 1,6 Kb e contém as sequências provenientes dos exons I_C , éxon II-V e a sequência 3'. Em relação aqueles produzidos pelos macrófagos, três foram identificados: dois de 1,8 kb e um de 2,0 kb, sendo produtos de *splicing* alternativos dos exons I_A , I_B e I_C (BARKER *et al*, 1997).

A maioria da transcrição nos hepatócitos é direcionada por um fragmento de 557pb que se inicia 20 nucleotídeos a 5' do sítio de transcrição e contém os sítios TATA Box e três elementos (X, Y e P), críticos para a eficiente transcrição tecido-específica. Tais elementos

compartilham características em comum com outros promotores de proteínas hepáticas de resposta aguda. A IL-6 (interleucinas 6), que é a principal citocina responsável pelas respostas de fase aguda, também atua na sobre regulação da transcrição da A1AT hepática, principalmente via fatores de transcrição NF-IL6, os quais tem no mínimo duas seqüências consensos dentro do promotor da A1AT (BARKER *et al*, 1997).

O gene da Alfa-1-antitripsina é altamente polimórfico (COHEN *et al*, 2005). Atualmente tem-se descrito aproximadamente 100 variantes diferentes (SERRA *et al*, 2008), das quais cerca de 30 podem ter implicações clínicas (SANDHAUS, 2004; CAMELIER *et al*, 2008). Dos alelos descritos, PI* M, PI*S e PI*Z apresentam-se com freqüências polimórficas (FARIA *et al*, 2005).

As variantes alélicas normais e/ou fenótipo mais freqüente, são pertencentes a família “M” (MM - *medium mobility*), as quais tiveram sua origem a partir do gene M1 (Ala²¹³) com subsequentes mutações que originaram os outros alelos mais comuns do sistema PI, tais como o M1(Val²¹³), o M2 e o M3 (COX *et al*, 1985.; NUKIWA e col., 1987) (FIGURA 03).

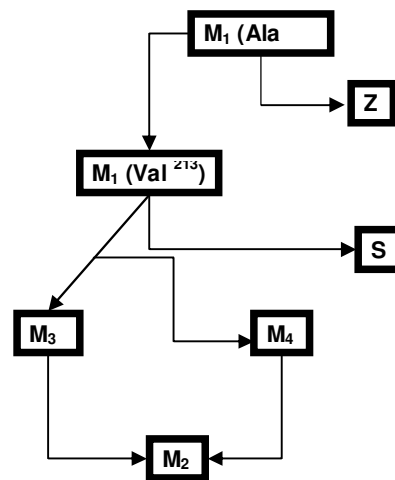


Figura 3: Árvore filogenética do gene da A1AT.
Fonte: Modificado de Luisetti & SeersHolm, 2004.

Os alelos PI*M estão presentes em 94 a 96% de caucasianos (SERRA e BANHA, 2008). As freqüências dos variantes normais PI*M (TABELA 1), variam, na população mundial, sendo PI*M1 mais freqüente em todas as populações, seguido de PI*M2 e PI*M3, nas populações Européias. O alelo PI*M4 é relativamente raro (BARKER *et al*, 1997).

Tabela 1: Frequências dos alelos do sistema PI em diversas populações do globo (em negrito a maior frequência observada para cada um dos alelos PI).

População	N	M ₁	M ₂	M ₃	S	Z	Outros
Índia	430	0,994*	-	-	-	0,006	
Oeste Africano	102	0,93	0,04	0,02**	-	0,01	
Negros Americanos	304	0,903	0,028	0,054**	0,005	0,003	0,007
Grécia	504	0,960*	-	-	0,028	0,002	0,006
Reino Unido	4042	0,930*	-	-	0,052	0,014	0,004
Arábia Saudita	204	0,926*	-	-	0,052	0,022	-
França	653	0,902*	-	-	0,071	0,014	0,007
Venezuela		0,805	0,07	0,062	0,05	0,009	0,002
Finlândia	136	0,79	0,12	0,08	-	0,01	
Japão	746	0,786	0,153	0,062	-	-	-
Dinamarca	909	0,728	0,136	0,082	0,022	0,023	0,009
Brasil	337	0,727	0,150	0,065	0,055	0,003	
Branços Americanos	904	0,724	0,137	0,095	0,023	0,014	0,007
China	1010	0,709	0,209	0,070	-	-	0,012
Alemanha	347	0,692	0,169	0,086	0,023	0,019	0,011
Holanda	357	0,679	0,147	0,129	0,029	0,013	0,003
Portugal	900	0,510	0,260	0,053	0,150	0,009	0,018

* Subtipos PI*M₁, PI*M₂ e PI*M₃ agrupados

** Subtipos PI*M₃ e PI*M₄ agrupados

Fontes: KUEPPERS & CHRISTOPHERSON, 1978; FRANTS & ERIKSSON, 1978; WEIDINGER *et al*, 1980; PAGOTTO, 1993; FONSECA-PEREZ *et al*, 1996; BARKER *et al*, 1997;

O elevado nível do polimorfismo genético da A1AT está ligado às variantes estruturais, derivadas da substituição isolada de um único aminoácido, identificadas pelo método de fenotipagem (COHEN *et al*, 2005). Estas variantes são nomeadas com letras do alfabeto (A-Z), classificadas conforme o sistema PI (*Protease Inhibitor*), e a velocidade de migração da molécula em um gradiente de pH isoelétrico em gel de poliacrilamida (DEMEO e SILVERMAN, 2004).

As duas variantes mais comuns que conferem níveis plasmáticos deficientes da proteína possuem as denominações “Z”, com migração em direção ao cátodo, e “S” (*slow*), com mobilidade catódica, no gel, mais lenta (SERRA *et al*, 2008).

De acordo com os níveis séricos e função molecular da alfa-1-antitripsina, temos quatro grupos de fenótipos classificatórios para as variantes (TABELA 2):

- Alelos Normais (M) – responsáveis por níveis séricos da proteína que variam de 20-53 $\mu\text{mol/l}$ (150-350mg/dl), quando em homozigose (BARKER *et al*, 1997);
- Alelos deficientes - caracterizam-se pelos níveis séricos da proteína estarem reduzidos para menos de um terço dos valores normais (CAMELIER *et al*, 2008), mas são

detectáveis, e estão associados à riscos elevados para desenvolvimento de doenças pulmonares e hepáticas, o que inclui as variantes deficientes mais frequentes Z e S, e variantes mais raras (LUISETTI e SEERSHOLM, 2004).

- Alelos Nulos (Null) - Atualmente são designados por QO (CAMELIER *et al* , 2008), implicam níveis não detectáveis no sangue, produzem taxas menores à 1% da concentração normal de A1AT no plasma, ou até mesmo nenhuma, representando menos de 1% de todos os alelos da alfa-1-antitripsina (TAKAHASHI e CRYSTAL, 1990).
- Alelos Disfuncionais - nível sérico da A1AT normal, mas com função reduzida, exemplos os alelos F e Pittsburgh, entre outros (CAMELIER *et al* , 2008). Tais alelos são considerados como alelos raros na população mundial (YANG *et al* , 1999; TETE-BENISSAN & GBEASSOR , 2009).

Tabela 2: Mostra a relação dos principais fenótipos da alfa-1-antitripsina e seus níveis séricos
Fonte: Modificado de VIDAL *et al* (2006).

Fenótipo	Nível Sérico de A1AT	
	mg/dl	μmol/L
PI*MM	103 - 200	20 – 39
PI*MS	100 - 180	19 – 35
PI*SS	70 - 105	14 – 20
PI*MZ	66 - 120	13 – 23
PI*SZ	45 - 80	9 – 15
PI*ZZ	10 - 40	2 – 8
PI nulo	0	0

1.2 PRINCIPAIS MUTAÇÕES DO GENE DA ALFA-1-ANTITRIPSINA

Entre as mutações de importância clínica destacam dois alelos predominantes, com abrangência a partir de evidências recentes, demonstradas por mapeamento genético indicativo ao surgimento destes. O alelo PI*Z teria surgido provavelmente no norte da Europa há 3.210 - 4.070 anos atrás no período neolítico, ou mais recentemente há 2000 anos. Já o alelo deficiente PI*S pode ter surgido antes, mas os dados são imprecisos, estimando a origem na Península Ibérica por volta de 8.370 - 14.100 anos atrás (SEIXAS *et al* , 2001 apud

CAMELIER *et al* , 2008). Estima-se que no mundo o número de portadores de variantes deficientes chegue a 3,4 milhões (de SERRES, 2002).

1.3 MUTAÇÃO Z

O alelo PI*Z é mais comum no noroeste da Europa, com frequências de 1,26 % (SVERGER, 1976), que diminuem de oeste a leste, e de norte a sul (LOMAS e PARFREY, 2004). São frequentes nos países escandinavos e está ausente em populações negras e orientais (WHO, 1997). Nas populações caucasóides dos Estados unidos, o alelo PI*Z dispõe de uma frequência 0,014 (COX e col. 1994), em Ribeirão Preto, estado de São Paulo/Brasil a frequência estabelecida foi de 0,03 (PAGOTTO, 1993) e, em São Luis do Maranhão, 0,007 (ANDRADE, 2003)

A mutação no alelo PI*Z teve origem no éxon V do gene da A1AT havendo a substituição da guanina na posição 9985 por uma adenina, o que ocasionou a troca do ácido glutâmico na posição 342 pela lisina na cadeia polipeptídica (CARLSON *et al* , 1989).

Quando em homozigose (PI ZZ), este alelo denota concentrações de A1AT no soro com variação entre 15 a 50 mg/dL, o que corresponde a aproximadamente 10 a 20% da concentração determinada pelos alelos PI*M (SERRA *et al* , 2008).

1.4 MUTAÇÃO S

O alelo PI*S é mais comum do que o alelo PI*Z, e representa 0,02 a 0,04 de todos os alelos do sistema PI em caucasianos no norte da Europa. Em indivíduos de origem da Península Ibérica, especialmente do norte de Portugal e na Galícia, região da Espanha, foi descrito com frequência de 0,15 (HUTCHISON *et al* , 1998).

Na Grécia e na Itália esse alelo representa frequências de 0,028 e 0,029, respectivamente (KLASEW *et al* , 1982). Em populações caucasianas dos Estados Unidos, as frequências são de 0,02 e 0,03 (COX e col., 1994), sendo a mutação do alelo PI*S raramente encontrada entre negróides e orientais. Em brasileiros, o alelo PI*S foi descrito com frequência de 0,05 em uma população do interior do Estado de São Paulo (PAGOTTO, 1993) e de 0,043 no Maranhão (ANDRADE, 2003).

A mutação PI*S ocorreu pela substituição (no códon do éxon III do gene) de uma adenina por timina, desencadeando a troca do ácido glutâmico na posição 264 da cadeia polipeptídica por valina (CRYSTAL *et al* , 1991).

Os homozigotos SS secretam em média 40% menos alfa-1-antitripsina do que células normais, atingindo níveis de 100-200mg/dL (CURIEL *et al* , 1989).

Nas últimas décadas muito se aprendeu sobre os polimorfismos genéticos, entretanto as pesquisas relacionando doenças infecciosas e a influência genética do hospedeiro somente tiveram um avanço significativo a partir do final da década de 90 com a evolução da informática (HOLFORD, 2000), tornando-se uma poderosa ferramenta para o entendimento de doenças infecciosas (IANUZZI *et al* , 2002).

Em relação à tuberculose, após extensa revisão bibliográfica realizada utilizando as ferramentas de busca do NCBI (www.ncbi.nih.gov), nos poucos trabalhos encontrados que relacionam TB a proteínas reativas de fase aguda (A1AT, alfa-1-macroglobulina, transferrina, alfa-1-glicoproteína ácida, proteína C reativa, ceruloplasmina, haptoglobina, etc.), foi identificado um aumento significativo dos níveis séricos da A1AT em pacientes com tuberculose (WONG & SAHA, 1989; GRANG *et al* , 1984), porém nenhuma referência ao polimorfismo é feita.

A A1AT é um fator do hospedeiro que pode proteger os indivíduos de infecções respiratórias. Em estudo realizado com pacientes com doença pulmonar causada por *Mycobacterium abscessus*, microorganismos de crescimento rápido, Chan *et al* (2007) encontraram uma estimativa 1,6 vezes maior na de prevalência de alelos não PI*M dentre os pacientes contaminados pelo referido microorganismo. Em estudos *in vitro*, tanto a A1AT como um inibidor sintético de protease de serina, suprimiram a infecção por *M. abscessus* em macrófagos derivados de monócitos em até 65%. Com tais resultados os autores sugerem que a A1AT pode ser um fator de defesa do hospedeiro contra microorganismos de crescimento rápido e que, fenótipos variantes do sistema PI podem constituir um fator de risco para doenças pulmonares por infecção devido aos citados microorganismos.

1. 5. DEFICIÊNCIA DA ALFA-1-ANTITRIPSINA

A deficiência da Alfa-1-Antitripsina (DAAT, DA1AT) é uma doença, ou distúrbio genético, de herança autossômica recessiva (NETO *et al*, 2004) que tem diversas implicações quanto ao aumento do risco de desenvolvimento de uma variedade de patologias, afetando especialmente pulmões e fígado (SANDHAUS, 2004; CAMELIER *et al*, 2008). É uma das doenças hereditárias mais prevalentes e, potencialmente letais, nas populações caucasóides (BARKER *et al*, 1997).

É também denominada deficiência do inibidor de proteinase α_1 , por ser esta pertencente a uma importante família gênica de inibidores de proteases de serina (PI), denominada Serpina, onde seus componentes são derivados de um gene ancestral comum, que

perfizaram uma evolução divergente, datada de 500 milhões de anos atrás (CRYSTAL *et al*, 1991). A importância desta família protéica é grande, onde cerca de 40 membros dessa família já foram descritos, desde simples organismos como os vírus, até organismos mais complexos como plantas e outros organismos superiores (COX, 1989; HUBBER e CARREL, 1989).

O primeiro caso relato da deficiência é de uma mulher no Alaska que faleceu há cerca de 800 anos (KUZEMKO, 1994), podendo também, ter sido a causa contribuinte da morte prematura de Frédéric Chopin em 1849 (KUZEMKO, 1994; KUBBA e YOUNG, 1997).

A primeira descrição formal da doença foi dada por Laurell e Ericksson (1963), que notaram a ausência da banda alfa-1 em eletroforeses de proteínas séricas, devido ao fato de que, em condições normais ele representa 90% da fração total (NETO *et al*, 2004).

Neste contexto histórico, padronizações no cuidado aos portadores, técnicas diagnósticas, tratamentos vêm sendo descritos e desenvolvidos, em contribuição à estudos epidemiológicos, de bases genéticas entre outros (AMERICAN TORACIC SOCIETY, 2003).

A DA1AT é um fator de risco para o desenvolvimento de sintomas respiratórios. Mas, os pacientes com esta deficiência geralmente são diagnosticados tardiamente, devido a apresentação de sintomas ou através de estudos familiares (STOCKLEY, 2004).

Há evidências de que em todos os países com alta frequência de indivíduos de origem caucasóide, o número de casos diagnosticados de deficiência de A1AT é inferior a proporção dos preditos pelas estimativas de frequências gênicas. Nestas populações a deficiência de A1AT é tão comum quanto a fibrose cística, embora seja subdiagnosticada (BARKER *et al*, 1997).

2. MICOBACTÉRIAS - *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias pertencem ao Gênero *Mycobacterium*, Família *Mycobacteriaceae*, Sub-ordem *Corynebacteriaceae*, Ordem *Actinomycetales* (ARANAZ, *et al*, 1999).

São bacilos finos, intracelulares facultativos que se proliferam lentamente no interior dos macrófagos, fato este que pode estar relacionado à absorção mais demorada dos nutrientes, devido a grande quantidade de lipídios na parede. Correspondem a seres aeróbios estritos e evidências sugerem que a predileção do *Mycobacterium tuberculosis* pelos pulmões está relacionada com a tensão de oxigênio neste órgão.

Estes organismos são álcool-ácido resistentes, e quando corados pela fucsina, não se deixam decorar por uma mistura de álcool e ácido clorídrico (coloração Ziehl-Neelsen), e não produzem fatores de virulência que possam explicar as manifestações clínicas de suas infecções que geralmente são acompanhadas de hipersensibilidade tardia e de imunidade celular. Esses fenômenos vêm sendo estudados na tuberculose, por aparecerem ao mesmo tempo e estarem sempre associados (TRABULSI *et al*, 2002).

O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, sendo a maioria saprófitas de vida livre, que constituem o complexo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* e *M. microti*, causam a tuberculose humana e animal. Recentemente, dois novos táxons foram incluídos como sub-espécies dentro deste complexo: *M. tuberculosis* subsp. *canetti* isolado na África e Europa (BARNES, 1991) e *M. tuberculosis* subsp. *caprae* isolada principalmente de caprinos (BRAGA, 1999).

Existem espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas, que não são pertencentes ao complexo *M. Tuberculosis*, como as dos complexos *M. avium intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* e *M. scrofulaceum*, causando principalmente doença pulmonar ou ganglionar (BRASIL, 2002).

A diferenciação de características dos membros do complexo *Mycobacterium* das outras micobactérias são a presença das seqüências genéticas IS6110, IS1081 e mpb70, a ausência de pigmentação das colônias, ausência de crescimento na presença de 500g/mL p-nitrobenzoato (PNB), 5% cloreto de sódio, catalase termoestável e arilsulfatase e a ausência de crescimento a 45° C (COLE *et al*, 1998).

2.1 PATOGENICIDADE

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (FIGURA 4) geralmente se inicia no parênquima dos lobos pulmonares inferiores, passando em seguida para os nódulos linfáticos da região hilar, levado posteriormente para vários órgãos e tecidos, através da corrente sanguínea. Esta primeira fase é chamada de complexo primário, e juntamente com os focos infecciosos que se formam em diferentes órgãos e tecidos, relatam a infecção primária, podendo apresentar dois tipos básicos de evolução (TRABULSI *et al*, 2002).

Primeiro quando ela progride constantemente transformando-se em tuberculose ativa, podendo acometer qualquer órgão, e a bactéria chega pela corrente sanguínea e desenvolve um foco infeccioso. A segunda, quando a infecção primária é interrompida bruscamente, o que ocorre em aproximadamente 90 a 95% dos indivíduos. Esta interrupção não é completa, e

a bactéria pode permanecer em vários focos infecciosos, se estabelecendo durante sua disseminação pela corrente sanguínea. Mesmo que não esteja viva, ela se encontra em estado de latência, e não se multiplica irregularmente (PELCZAR, 1996).

Os focos de infecção latente podem ser reativados, e os que mais sofrem reativação são os dos ápices pulmonares, explicando a grande prevalência desta forma clínica, também conhecida como tuberculose secundária, pós-primária, entre outras. Essa reativação pode ter vários fatores de influência como idade, sexo, fatores étnicos e constituição genética, não sendo bem conhecidos, mas estão intimamente ligados a uma diminuição das defesas orgânicas (PELCZAR, 1996).

O *Mycobacterium tuberculosis* determina três tipos básicos de reações inflamatórias:

- Exsudativa - encontrada principalmente na infecção primária, antes do desenvolvimento de hipersensibilidade tardia.
- Produtiva - se caracteriza pela formação de granulomas ou tubérculos, que geralmente aparecem quando a quantidade de bacilos ou de antígenos no sítio de infecção é baixa e a hipersensibilidade tardia apresenta níveis elevados.
- Necrótica - ocorre quando a quantidade de antígeno no local da infecção e a hipersensibilidade dos tecidos são bastante elevadas. Embora possa ocorrer durante a infecção primária, a necrose é característica da tuberculose secundária (PELCZAR, 1996).

A hipersensibilidade tardia pode ser detectada pelo teste da tuberculina ou injeção intradérmica de tuberculina que recebem a designação de PPD (*Purified Protein Derivative*), no qual um extrato de proteínas produzidas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, parcialmente purificadas, é injetado sobre a pele, o teste positivo é indicado por uma zona intumescida e avermelhada no local da injeção, dentro de 48 horas (PELCZAR, 1996).



Figura 4: Demonstração de colônias de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fonte: www.fiocruz.br/ccs/media/ipecc

2.2 DISSEMINAÇÃO

Destacam-se quatro vias de disseminação pelas quais os sítios extrapulmonares podem ser acometidos na tuberculose (BRASIL, 2002)

1- Via linfohematogênica, responsável pela maioria das formas extrapulmonares da doença. É o caminho natural do bacilo após sua entrada no organismo, tuberculose ganglionar, renal, adrenal, óssea, meningoencefálica, ganglionar intra-abdominal e genital feminina.

2- Via hematogênica, podendo ocasionar formas disseminadas agudas da doença, se houver ruptura da lesão diretamente no vaso.

3- Via por contiguidade responsável pelas formas pleural a partir do pulmão, pericárdica a partir de gânglios mediastinais, peritoneal a partir de gânglios mesentéricos, alças intestinais ou trompas e algumas formas de tuberculose cutânea peri-orifical a partir, por exemplo, de focos ósseos.

4- Via intra-canalicular, onde as vias aéreas altas a partir do pulmão são comprometidas, trato urinário inferior e sistema genital masculino a partir do rim, endométrio e peritônio a partir das trompas..

Pacientes com tuberculose pulmonar ativa disseminam grandes quantidades de organismos (STROHL *et al*, 2004), o contágio ocorre por via inalatória, a partir de gotículas em aerossol, durante o ato da tosse, fala e espirro.

Os aerossóis ficam em suspensão no ar como gotículas microscópicas (chamadas de gotículas de Pflugge) que ao serem aspiradas por uma pessoa sã, ultrapassam os mecanismos

de defesa da árvore respiratória depositando-se nos alvéolos pulmonares onde iniciarão o processo patológico da doença (PELCZAR, 1996).

Os pacientes não bacilíferos e os que apresentam a forma extrapulmonar não oferecem risco significativo de contaminação, bem como os indivíduos que mesmo bacilíferos fazem tratamento correto após 2 semanas, obtêm a perda da infecciosidade do bacilo e, praticamente, não há mais risco de infecção (STROHL *et al*, 2004).

Outras vias de transmissão também são possíveis como a digestiva, cutânea entre outras, mas são raras e não possuem importância epidemiológica.. (HISTÓRICO DA TUBERCULOSE, 2008).

3. TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) foi caracterizada como doença infecciosa, em 1882, quando Robert Koch definiu o *Mycobacterium tuberculosis*, como sendo seu agente causador (<http://www.scientific-web.com/en/Medicine/Biographies/RobertKoch01.html>).

Afeta a humanidade há pelo menos cerca de 8.000 anos (RODRIGUES *et al*, 2007), possui grande importância histórica, com influência no avanço das ciências biomédicas e cuidados com a saúde. Está documentada no Egito, Índia e China desde o início dos 5.000, 3.300 e 2.500 anos, respectivamente (DANIEL, 2006).

É uma doença crônica, infecto-contagiosa, que se caracteriza anátomo-patologicamente pela presença de granulomas e de necrose caseosa central. Pode atingir todos os grupos etários, embora cerca de 85% dos casos ocorram em adultos e 90% em sua forma pulmonar. De cada 100 pessoas que se infectam com o bacilo, cerca de 10 a 20% adoecerão (AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS, 2006).

A TB pulmonar permanece como a doença infecciosa, com um único agente – o *Mycobacterium*, que mais mata no mundo (FRIEDEN *et al*, 2003), pois não precisa de vetor para se espalhar, passando de pessoa à pessoa (SILVA & BOÉCHAT, 2004).

Com ampla distribuição geográfica, consiste de sérios problemas de saúde pública em todo o mundo (ROSEMBERG, 1999), seu agravamento está na emergência de bactérias resistentes aos principais medicamentos usados, e pela sua grande capacidade de disseminação (GLYNN *et al*, 2002 apud SIQUEIRA *et al*, 2009).

A tuberculose integra uma preocupação sanitária internacional (VENDRAMINI *et al*, 2003), por estar ligada a vulnerabilidade ao tratamento medicamentoso, à pobreza, às

interações das desigualdades sociais, aos fluxos migratórios, deficiências do sistema de saúde integrados ao descuido nos programas de controle pelos governos, e alta prevalência dos casos de TB multi-drogas resistente associados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BARREIRA & GRANGEIRO, 2007).

Em nível global, a região das Américas tem destaque em 4 % das notificações de tuberculose, (VENDRAMINI *et al*, 2007). Em contexto nacional, o Brasil é o único país da América Latina, que está incluído entre as vinte e duas (22) nações responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (WHO, 2001).

A Amazônia é a região com maior risco de infecção, em decorrência dos elevados níveis de incidência. O estado de Rondônia apresenta incidências intermediárias, pois a distribuição dos casos, não é uniforme, e tanto a prevalência² como a incidência³ enfocam as variações entre os municípios, ligados aos diferentes extratos sócio-econômicos, bem como os grupos étnicos (ESCOBAR *et al*, 2001). Porto Velho está entre as dez capitais brasileiras com os maiores níveis de incidência em tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). (FIGURA 5).

² Representa a proporção de pessoas com determinado resultado de saúde num dado momento temporal. Deste modo, a taxa de prevalência representa a proporção de pessoas com determinada doença ou sintoma, ou que apresentam uma determinada característica individual de saúde, sua determinação está naturalmente associada ao estudo transversal na observação, sendo o estudo de prevalência mais adequado a condições de saúde com certa permanência temporal, como acontece, por exemplo, nas doenças crônicas. (AGUIAR *et al* , 2007).

³ Diz respeito ao número de novos casos de um determinado resultado de saúde num espaço de tempo definido, a determinação da incidência está associada ao estudo longitudinal na observação do tipo estudo coorte. (AGUIAR *et al* , 2007).

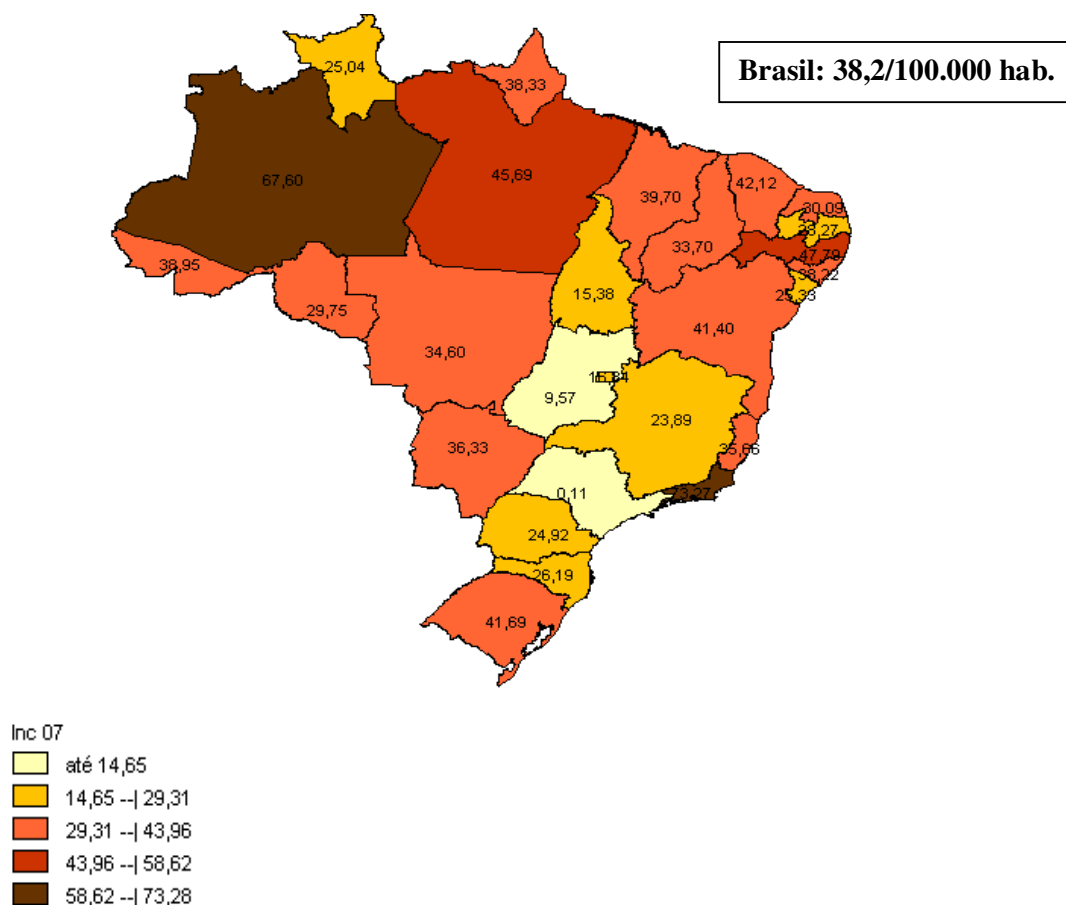


Figura 5: Demonstrando da incidência de tuberculose (casos por 100.000 habitantes), 2007.
Fonte: MS / SVS / SINAN e IBGE

A tuberculose já foi equivocadamente considerada como controlada na década de oitenta, mas por entrelaçar diversos fatores, ela obteve seu ressurgimento delineando ênfase em vários outros campos, como o avanço nas pesquisas científicas, e principalmente no interesse do conhecimento referente aos mecanismos de disseminação da doença propriamente dita, e até mesmo os mecanismos imunitários da tuberculose. Neste contexto, é importante salientar, que a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, podem ter três desfechos, controle primário (imunidade inata), a doença ativa ou a TB latente (SILVA & BOÉCHAT, 2004).

A tuberculose latente destaca um âmbito onde cerca de 2 bilhões de pessoas, ou seja, 1/3 da humanidade convive com a micobactéria assintomaticamente e desses, apenas 10% irá desenvolver TB ativa (ROSEMBERG, 2001).

A tuberculose ativa é basicamente uma doença pulmonar, sendo o pulmão a porta de entrada da micobactéria, e principal local de manifestação da infecção (TEIXEIRA *et al*,

2007). Na doença ativa, 80% das formas clínicas estão localizadas no pulmão (GRÁFICO 1 e GRÁFICO 2), sendo importante salientar, que a forma pulmonar é a única com importância epidemiológica, propiciando a transmissão, bem como a manutenção do ciclo da doença (SILVA & BOÉCHAT, 2004).

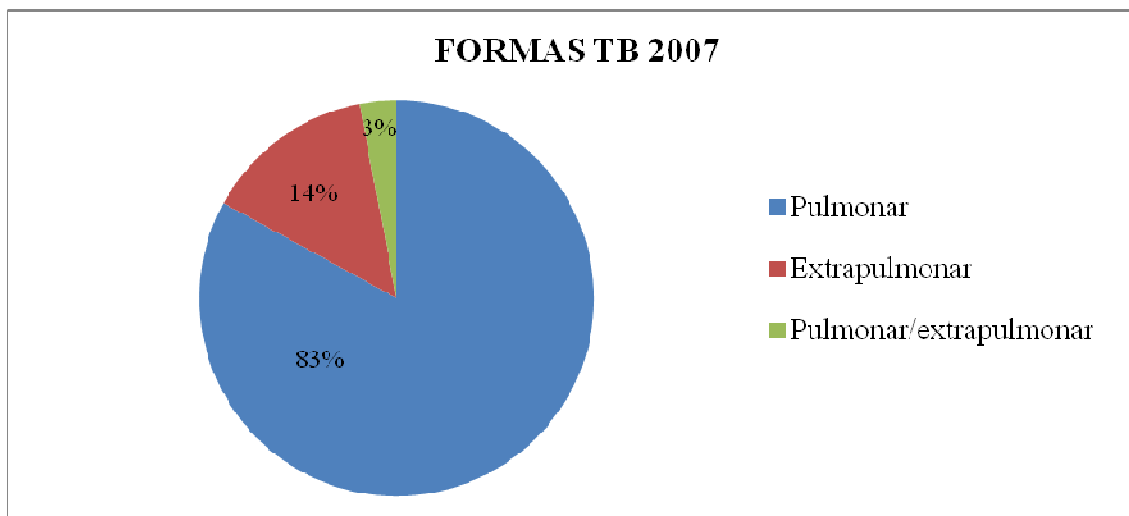


Gráfico 1: Dados do Ministério da Saúde quanto a percentagem das formas de TB no Brasil, no ano de 2007.
Fonte: MS / SVS / SINAN.

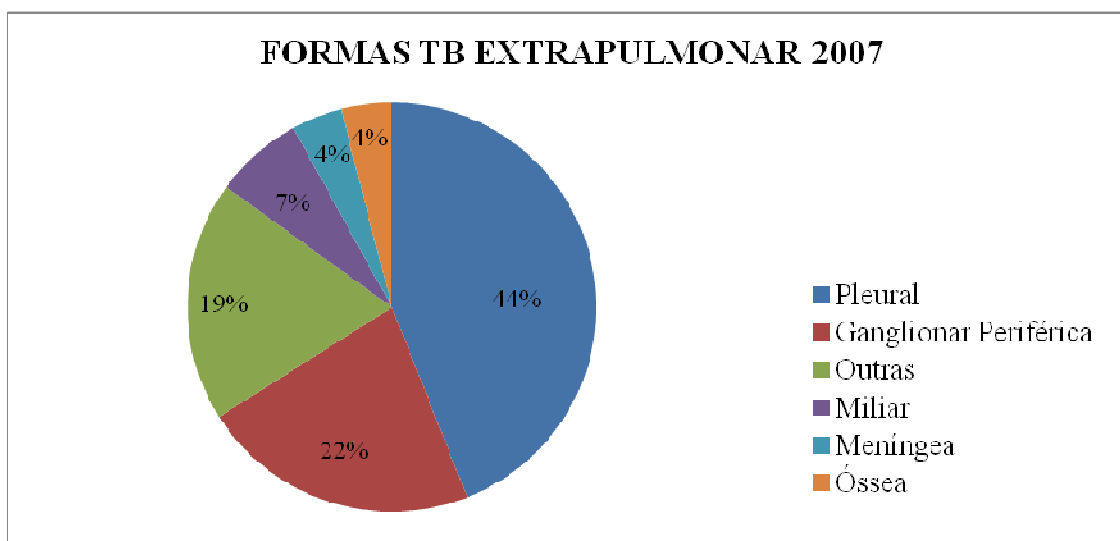


Gráfico 2: Dados do Ministério da Saúde quanto a percentagem das formas de TB Extrapulmonar no Brasil, no ano de 2007.

Fonte: MS / SVS / SINAN.

3.1 TUBERCULOSE PULMONAR

A tuberculose pulmonar é dividida em primária (primoinfecção) e secundária ou pós-primária (CAPELLOZI, 2000), a TB primária ocorre com indivíduos que não tiveram contato com o bacilo, sendo uma doença de crianças, embora sua incidência venha aumentando em adultos nos últimos anos (FILHO *et al*, 2004), assim, quando o *Mycobacterium tuberculosis* é inalado ele atinge os alvéolos, fazendo com que ocorra um processo inflamatório, mediado por neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos alveolares, resultando na formação de um nódulo exsudativo (BOMBARDA *et al*, 2001).

Já a tuberculose pós-primária caracteriza-se comumente, pelo adoecimento de adultos e adolescentes. Frequências relevantes surgem entre a co-infecção TB/HIV, acometendo 60% à 70% dos casos (DUNLAP *et al*, 2000).

A TB pulmonar confirma seu diagnóstico na corroboração de duas baciloscopias positivas de escarro, uma cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis*, radiografia de tórax sugestiva ou outros exames complementares, que farão inferência a doença (BRASIL, 1995).

3.2 TRATAMENTO

As drogas utilizadas no tratamento das infecções causadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, geralmente estão divididas em drogas de primeira e segunda linha. As de primeira linha, são as mais usadas, têm ativação maior e são menos tóxicas, são usadas para os casos virgens de tratamento, comumente conhecidos como “Esquema I”, e possuem padronização desde 1979 pelo Ministério da Saúde, são a isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomicina e etambutol (PELCZAR, 1996).

As designadas como sendo de segunda linha, geralmente são menos ativas ou mais tóxicas, usadas somente em substituição às drogas de primeira linha, indicados para pacientes com falência ao esquema I, caracterizados como “Esquema III”. O “Esquema II” é um esquema especial derivado para casos com associações amplas, são ácido para-amino-salicílico (PAS), etionamida (derivado do ácido micólico), tiocetozona e os seguintes antibióticos: canamicina, viomicina, capreomicina e amicacina. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

3.3 MECANISMOS IMUNITÁRIOS DA TB

Por se tratar de uma patologia grave, e que mantêm seu histórico evolutivo, pesquisas não só voltadas a epidemiologia, e controle da doença propriamente dita, tornaram-se prioritárias. Análises moleculares começaram a concretizar o conhecimento quanto a complexidade dos processos imunitários quando da infecção pelo bacilo, demonstrando como o organismo humano o recebe, impedindo que a doença progrida. Testes relativos ao conhecimento da dinâmica de transmissão da tuberculose vêm sendo realizados pelo uso de técnicas de genotipagem que permitem a diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. Em associação a estes estudos, implicam-se o conhecimento da imunopatogenia da tuberculose, com a atuação do sistema imune do hospedeiro (SEPKOWITZ *et. al*, 1995.; SMALL *et.al*, 1994 apud BORGES *et.al*, 2004).

Através de pesquisas mais detalhadas, sabe-se que a infecção pelo *M. tuberculosis*, é mediado pela interação das células T com os macrófagos infectados, tornando-se fatores intrínsecos da imunidade protetora contra o bacilo, e as citocinas produzidas por estas células regulam a resposta imunológica bem como a inflamatória (RAJA, 2004).

As células T são elaboradas no timo, sendo as CD4 auxiliares no desempenho da função principal na resposta imune à micobactéria, e as CD8 citotóxicas, reconhecem antígenos presentes no citoplasma e também participam na resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis* (NORTH e JUNG, 2004).

Componentes genéticos podem estar correlacionados com a susceptibilidade do hospedeiro e resistência à ocorrência de TB infecção e TB ativa, um exemplo sobre estes componentes seria a concordância que entre gêmeos monozigóticos comparados com os dizigóticos, onde há o indicativo de susceptibilidade herdada. (STEAD, 2001).

Estes fatores são importantes, devido às doenças estarem ligadas aos nossos genes, e se houver qualquer alteração pode-se originar uma doença hereditária grave, predisposição ao desenvolvimento de doenças crônicas, ou vulnerabilidade a uma doença infecciosa. Mas os genes de susceptibilidade por si só não causam a doença, os genótipos estão associados com diferentes graus de susceptibilidade ou risco para uma doença complexa, podendo ser designados polimorfismos (ROSSI, 2000).

A identificação dos genes relacionados a certas doenças infecciosas, tais como variantes dos genes α e β - globina, G6PD, dentre outros, com efeito de resistência à malária, assim como variantes alélicas de ICAM-1 e TNF, foram sugeridas como conferindo efeito de

susceptibilidade à TB, outras denotações cercam as variantes HLA-DR2, mutações do gene VDR e mutações do gene NRAMP-1, como estando implicados na resistência à TB. (LALANI *et. al* ,1999).

Os polimorfismos do NRAMP-1 revelam-se em associação à tuberculose, apresentam maior frequência que os alelos selvagens, em pacientes com a doença tuberculose, (BELLAMY *et al.*,1998b). Suas alterações moleculares estão associadas mais com a susceptibilidade para TB do que a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* (NORTH & MEDINA, 1998).

A ativação dos mecanismos propostos sobre o combate a resistência da micobactéria pelos macrófagos, é realizada por IFN, TNF, VDR e IL-6 (ARMSTRONG, 1971), que promovem o desaparecimento das micobactéria, e da atividade do processo inflamatório e da resposta ao tratamento. (PERESI *et al* 2008).

Outros fatores cruciais revelam os níveis de indução da resposta de fase aguda (RFA), verificando-se um aumento da síntese hepática e de níveis séricos das proteínas atuantes que promovem a correlação quanto a infecção por *M. tuberculosis* a proteínas reativas de fase aguda, alfa-1-antitripsina, alfa-1-macroglobulina, transferrina, alfa-1-glicoproteína acida, proteína C reativa, ceruloplasmina, haptoglobina, etc, (MAEDA *et.al*, 1995).

Estudos tratam da existência de citocinas como as de perfil Th1 compostas por citocinas como FNI γ que participa intensamente na proteção contra o *M. tuberculosis*, importante elemento na defesa contra micobactérias em geral, e a IL-2, que ajudam na ativação dos mecanismos microbicidas do macrófago, e as Th2, equivalentes as citocinas IL4, IL5 e IL10, agindo para desativar o macrófago (LAPA e SILVA, 2004).

Uma das principais interleucinas que participa na superação da fase aguda da infecção tuberculosa, geralmente em associação com o TNF α , é a IL6 (FLESH, 1987; COOPER, 1993; PEM, 2000; PERESI *et.al*, 2008).

A resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis*, sugere que variações na produção de citocinas entre indivíduos podem estar associados à diferentes polimorfismos genéticos (OLIVEIRA *et.al* 2004), dentre eles, polimorfismos de base única (SNPs) no promotor TNF nas posições 238, onde se encontram relações à proteção, assim como a susceptibilidade a doenças como hepatite B e C crônica (WILSON,1992), e 308 associada com a susceptibilidade a várias enfermidades, (KALUZA, 2000), dentre as quais a malária

cerebral (MCGUIRE, 1994), leishmaniose mucocutânea (CABRERA, 1995), hanseníase (ROY, 1997).

Estes estudos correlatos podem representar avanços na descoberta para o controle da TB, novos tratamentos e estabilidade de respostas protetoras contra a doença.

Sabendo que durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* ocorre um aumento no nível sérico da proteína Alfa-1-Antitripsina (A1AT), diretamente relacionado com resposta imunológica ao combate da infecção, e que os alelos PI*Z e PI*S determinam uma produção deficiente desta proteína no soro, no presente trabalho se propôs investigar a existência da ocorrência dos alelos do sistema PI (PI*S e PI*Z) em pacientes com tuberculose pulmonar, na cidade de Porto Velho (RO).

4. OBJETIVOS

4.1. Geral:

Investigar a ocorrência dos principais alelos determinantes da deficiência plasmática de alfa-1-antitripsina em pacientes com diagnóstico para TB pulmonar na cidade de Porto Velho (RO).

4.2. Específicos:

Determinando as frequências gênicas e genotípicas dos alelos PI*M, PI*S e PI*Z do sistema de inibidores de proteases (PI) em pacientes TB positivos, bem como o levantamento do perfil epidemiológico destes;

Investigando a existência de associação entre os alelos do sistema PI com tuberculose pulmonar.

5. METODOLOGIA

Este trabalho foi executado em duas etapas e propôs inicialmente uma verificação do perfil epidemiológico de pacientes com diagnóstico de tuberculose (TB) positivos, atendidos nas unidades de saúde: Policlínica Oswaldo Cruz, Policlínica Rafael Vaz e Silva e Posto Municipal Maurício Bustani no município de Porto Velho (RO), nos anos de 2007 à 2008, através do levantamento de dados de prontuários, seguindo-se a coleta de material biológico dos mesmos, para as verificações propostas a partir dos objetivos, através da genotipagem do sistema PI.

Estabelecemos contato com as referidas unidades de saúde, por serem as mais centralizadas, e por manterem o programa de controle da Tuberculose, pois a partir delas os pacientes são encaminhados para postos ou unidades de saúde mais próximos as suas residências.

Toda a pesquisa foi desenvolvida com autorização da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Porto Velho e do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Rondônia (carta 007/2009/CEP/NUSAU).

5.1. Material e Métodos

Amostra:

Amostra populacional coletada aleatoriamente (controle):

Utilizaram-se 46 amostras de uma população geral do município de Porto Velho, para comparação das frequências dos alelos PI*S e PI*Z, previamente genotipadas quanto ao sistema PI (ASSUNÇÃO-SILVA, 2009), cedidas pelo laboratório de Genética (CIBEBI) da Universidade Federal de Rondônia – UNIR. Estas amostras provieram de indivíduos que tiveram seus DNAs extraídos e analisados em relação a teste de identificação genética/investigação de paternidade.

Amostragem de prontuários (etapa 1):

Foi realizado o levantamento de dados de prontuários de pacientes com diagnóstico de TB positivo, nos anos de 2007 e 2008, nas unidades de saúde acima citadas.

Aos diretores das Unidades Básicas de Saúde citadas, foram entregues comprovantes formais da solicitação que confirmava a autorização para a realização da coleta de dados dos

pacientes em seus prontuários. As variáveis identificadas foram nome completo, endereço, sexo, idade, profissão, início de tratamento, formas clínicas de TB, resultando em uma lista final com 265 prontuários avaliados.

A partir deste levantamento, foram descartados os prontuários que não constavam endereço, aqueles cujos pacientes não residiam no município e os apenas, restando o quantitativo de 227 pacientes selecionados para coleta de material biológico. Com o auxílio do mapa (atualizado) do município de Porto Velho, para cada paciente foi destacado e selecionado os endereços, por rua, bairro e CEP, obtidos através dos sites (www.correio.com.br – www.googlemaps.com.br).

Depois desta divisão foi montado um cronograma para contato com os pacientes e coleta das amostras:

1º) a partir da lista separada por endereços/bairro, foi marcado no mapa do município algumas Unidades Básicas de Saúde (UBS) distribuídas por setores.

Dentre estas unidades, foram selecionadas as cinco mais centralizadas, isso para facilitar o acesso dos pacientes, tentando classificá-los o mais próximo de suas residências, destacando-se as Policlínica Rafael Vaz e Silva, Centro de Saúde Ernandes Índio, Policlínica Oswaldo Cruz, Centro de Saúde Nova Floresta e Policlínica Hamilton Raolino Gondin.

2º) Agendou-se, nas UBS, uma data para ser realizado um encontro/contato com os pacientes. Esta metodologia se fez necessária, devido ao fato da quantidade de pacientes, seria impossível ir à residência de cada um para explicar sobre o trabalho e solicitar colaboração/participação através da coleta de material biológico por punção digital (descrita em materiais).

3º) Após o agendamento em cada UBS, para encontro com os pacientes e coleta, enviou-se correspondências e/ou carta-convite (em anexo), para a participação na atual pesquisa. Além das correspondências, na semana que antecedia o encontro foi feito contato telefônico com cada um dos indivíduos previamente listados, confirmando o recebimento das correspondências e dando explicações sucintas sobre a mesma.

Por motivos éticos, não foi abordado diretamente a participação referenciando a doença, devido ao fato de que muitas pessoas não levam o conhecimento do tratamento que estão fazendo para seus familiares, descrições das enfermeiras responsáveis pelos setores de tuberculose das UBS, das quais já haviam sido previamente contatadas.

4º) Nos dias agendados, os pacientes voluntários que compareceram, após lhes serem apresentados o propósito da pesquisa e qual a importância de participação, foi solicitado a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo) e preenchido um breve questionário para coleta de dados de antecedentes pessoais e familiares (em anexo). Dos pacientes aos quais foram enviadas as correspondências e não compareceram, foi feita uma reclassificação para a próxima UBS a ser visitada, remetendo novamente as correspondências, bem como os telefonemas individuais.

Após o início do levantamento dos prontuários, a Policlínica Oswaldo Cruz, encerrou seu programa de Controle de Tuberculose na unidade, passando os prontuários (dos referidos anos de 2007 e 2008) e atendimento, para o Hospital CEMETROM. Frente a esta problemática, foi feito contato com a enfermeira responsável pelo setor de TB do referido hospital e diretor geral do hospital adotando o mesmo procedimento de contato das demais unidades, obtendo assim, autorização para a realização de nossas atividades e término do levantamento dos dados dos prontuários.

Amostragem de pacientes com tuberculose pulmonar (etapa 2)::

Consistiu-se na coleta de material biológico de pacientes identificados durante a primeira etapa como sendo positivos para tuberculose pulmonar e que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa. Posteriormente foi feita a análise laboratorial para levantamento da frequência dos alelos do sistema PI.

Descrição das amostras/ critérios de inclusão e exclusão do estudo:

Os pacientes selecionados e contatados que compareceram aos dias estabelecidos para coleta das amostras, foram informados sobre o objetivo da pesquisa, e lhes foi oferecida a oportunidade de participação no projeto, através do aceite do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

Os critérios relacionados a inclusão dos pacientes colaboradores na pesquisa, foram definidos por tópicos simplificados, onde estes deveriam ter sido diagnosticados como TB positivos, tipo pulmonar, e que quanto a menores de idade, somente seria coletado material biológico, cujos pais ou responsáveis dessem seu consentimento formal para a participação.

Procedimentos:

Coleta e processamento das amostras:

A coleta do material biológico constou de amostras de sangue venoso, coletadas utilizando uma lanceta descartável, através de punção na região posterior da falange distal dos dedos médio ou anular (a critério do paciente), com prévia assepsia com algodão hidrofílico embebido em álcool 70%. Coletaram-se aproximadamente 50 µL de sangue em tubo capilar heparinizado.

O capilar depois de preenchido teve uma das extremidades seladas com massa de modelar atóxica e foi armazenado em local devidamente identificado com as iniciais do paciente e número do registro dos prontuários. A mesma identificação também foi colocada na ficha do paciente, de modo que durante todos os procedimentos laboratoriais, a amostra foi trabalhada de forma codificada, visando preservar a identidade do paciente.

Para a extração e análise do DNA, foi realizada no laboratório de genética do CIBEBI-UNIR, foi utilizado o método de precipitação de proteínas, com algumas modificações (ALJANABI, 1997). O sangue foi transferido para um tubo de polipropileno estéril, devidamente identificado, e a este acrescentado 200µl de tampão A (Tris-HCl pH 8,0 10mM, NaCl 0,4 M e EDTA pH 8,0 2mM) + 20 µl de SDS 20% + 8 µl de Proteinase K (10 mg/ml). Esta mistura foi incubada, por no mínimo 1 hora, à temperatura de 55 a 60°C. Após incubação adicionou-se ao tubo 150 µl de NaCl 6M, para que ocorresse a precipitação das proteínas sedimentadas por centrifugação a 10.000 G por 30 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi coletado e transferido para outro tubo de polipropileno estéril, devidamente etiquetado, e adicionado a este duas vezes o volume de isopropanol (PA) gelado. Tal procedimento culminou na precipitação do DNA que estava em solução, sendo que este foi recuperado por centrifugação (a 10.000 G por 30 minutos), e ressuspendido com 20 µl de TE.

Análise do sistema PI

Todas as amostras coletadas foram genotipadas quanto a presença dos alelos PI*S e PI*Z do gene A1AT, segundo técnica descrita por LUCOTTE e SESBOÛE (1999) que utiliza dois pares de iniciadores específicos para amplificar as regiões do éxon III e V, respectivamente, do referido gene:

Primers éxon III (identificação alelo PI*S)

5'-TGAGGGGAAACTACAGCACCTCG-3'

5'-AGGTGTGGGCAGCTTCTTGGTCA-3'

Primers éxon V (identificação do alelo PI*Z)

5'-ATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3'

5'-TTGGGTGGGATTCACTTTTC-3'

A amplificação ocorreu através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em um Termociclador PT100-MJResearch. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial por 10 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 2 min a 94°C, pareamento por 2 min a 55°C, extensão 3 min a 72°C. Finalizou-se a PCR com um último ciclo de extensão por 10 min a 72°C.

Primeiramente, obtivemos padronização da técnica de PCR com a utilização de amostras já processadas no CIBEBI, na conclusão de outro trabalho (MAGNO, 2008) cuja concentração de DNA já era conhecida. Desta forma, as reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µl seguindo-se as condições: Tampão da *Taq* 1X, 100µM iniciadores, 2mM dNTP, 3mM MgCl₂, 3 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 1 ng de DNA genômico.

Os fragmentos amplificados tiveram visualização através de uma eletroforese em gel nativo de poliacrilamida 6%. As amostras foram submetidas, por 2:30 horas, a 200 Volts, 100 **Miliampères** e 80 Watts. Para coloração, o gel foi submetido a impregnação por nitrato de prata e posterior revelação fotográfica.

Visando aumentar a quantidade do amplicom para posterior clivagem enzimática, as amostras que foram bem sucedidas na amplificação foram submetidas a uma co-amplificação segundo as concentrações da PCR da padronização, utilizando-se para tal uma quantidade de 0,5 µl do produto da PCR. A esta segunda amplificação, seguiu-se a digestão enzimática.

Na digestão enzimática utilizamos 20 µl de produto de PCR o qual foi clivado com BSA 0,1X, Tampão NE4 1X e 20 Unidades de *Taq I* (fornecido pela Prodimol Biotecnologia). A digestão procedeu-se por 3 horas a 65°C, e por 1h a 20°C, no termociclador PT100-MJResearch. Após a digestão, os fragmentos foram identificados novamente através da utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 6% e coloração com nitrato de prata, permitindo a identificação dos alelos PI*S e PI*Z.

Os amplicons originados da PCR, quando observados em gel de poliacrilamida,

apresentam-se como fragmentos de DNA de 121pb e 179pb, respectivamente, para os iniciadores que paream as regiões amplificadas dos éxons III e V. A digestão enzimática destes fragmentos resultou em novos fragmentos indicadores da ausência das mutações PI*S e PI*Z. Desta forma, a observação de fragmentos de 100pb e 157pb, foi considerada indicativa da presença de alelo PI*M. A não observação de digestão dos amplicons, isto é, manutenção dos fragmentos de 121pb e 179 pb, implicou na identificação da presença dos alelos PI*S ou PI*Z, respectivamente.

Análise estatística

As análises estatísticas descritivas da população foram realizadas através da utilização do programa SPSS 13.0 (Windows). Para os cálculos de frequências gênicas e genotípicas, bem como para testar a aderência à amostra ao Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), foi utilizada a versão online do programa GENEPOP ON THE WEB, versão 4.0.10 (RAYMOND & ROUSSET, 2010). O cálculo do Risco Relativo foi realizado pelo método de Wolf, utilizando-se o programa Woolf, da programoteca GENIOC (CABELLO & KRIEGER, 1987).

6. RESULTADOS

Da primeira etapa, levantamento dos dados, foram analisados 227 prontuários, sendo que destes, 44 % dos casos foram referentes ao ano de 2007. A idade média foi de 35,4 anos (dp= 16,35).

Em relação ao tipo de tuberculose, 6,8% dos prontuários analisados não possuíam tal referência, 84,2% correspondia a TB pulmonar e o restante, 7%, eram referentes a pacientes com TB extra-pulmonar (GRÁFICO 3).

Não foram encontradas diferenças significativas quando comparadas os tipos de TB nas diversas faixas etárias ($p=0,229$), bem como quando comparados em relação ao sexo do paciente ($p=0,392$).

A comparação estatística entre as distribuições dos tipos de TB considerando ocupação (grupos 1 a 3) não demonstrou associação significativa ($p= 0,132$). Não foi observada diferença significativa quando se analisaram conjuntamente o tipo de TB, estado civil e tipo de ocupação.

Dos 227 prontuários analisados, compareceram à chamada para coleta de amostra biológica 69 indivíduos (sendo que, por ocasião da determinação do total de amostras de material biológico coletado, tem-se destaque 70 amostras, pois, o paciente que completou este total, na fase da coleta de dados epidemiológicos básicos, não estava incluso aos 227 prontuários analisados nas UBS nos anos de 2007 e 2008. Ele começou seu tratamento no final de 2008, e não foi em nenhuma das UBS destacadas nas coletas de dados dos prontuários. O contato com o referido paciente foi realizado apenas no dia das coletas de material biológico, pois o paciente ficou sabendo da coleta que estava sendo realizada próxima a sua residência, houve interesse, e aceitou a participar do projeto).

A média de idade dos pacientes contatados foi de 35,91 anos (dp = 17,45), sendo que o paciente mais novo possuía 4 anos e o mais idoso, 73 anos. Evidenciou-se uma leve predominância do sexo masculino na amostragem realizada, caracterizada com 52,17% de indivíduos (GRÁFICO 4).

Em relação à etnia, a amostragem evidenciou um predomínio de indivíduos que se declararam caucasiana (GRÁFICO 5) e, em se tratando da escolaridade dos pacientes voluntários, aproximadamente 55% possuem ou estão cursando o ensino fundamental (GRÁFICO 6).

Análise do tempo de uso dos medicamentos pelos pacientes voluntários na pesquisa está demonstrada no GRÁFICO 7. O acompanhamento do diagnóstico final referente ao tratamento dos pacientes voluntários pode ser visualizado no GRÁFICO 8.

Dos 70 pacientes com TB que tiveram amostras biológicas coletadas, foram obtidas amplificações para 66 amostras, que após digestão enzimática possibilitou a identificação de quatro genótipos, distribuídos como segue: 59 indivíduos PI*MM (89,39%), 4 indivíduos PI*MS (6,06%), 01 indivíduo PI*SZ (1,15%) e 2 indivíduos PI*MZ (3,03%). (FIGURA 6)

Prontuários qualificados segundo a informação contida em relação ao tipo de tuberculose do paciente

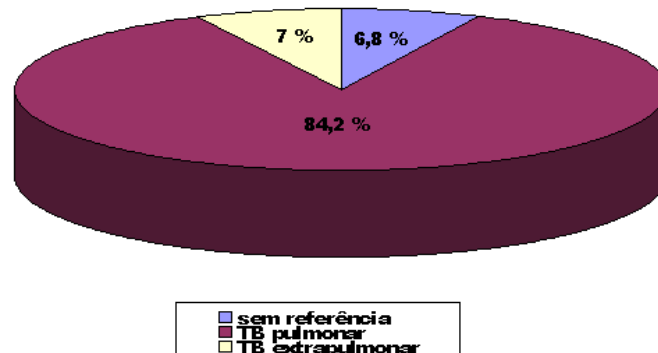


Gráfico 3: Demonstra um gráfico com os resultados das análise quanto a informação do tipo de TB, dos pacientes atendidos nas Unidades Básicas de Saúde, no município de Porto Velho/RO

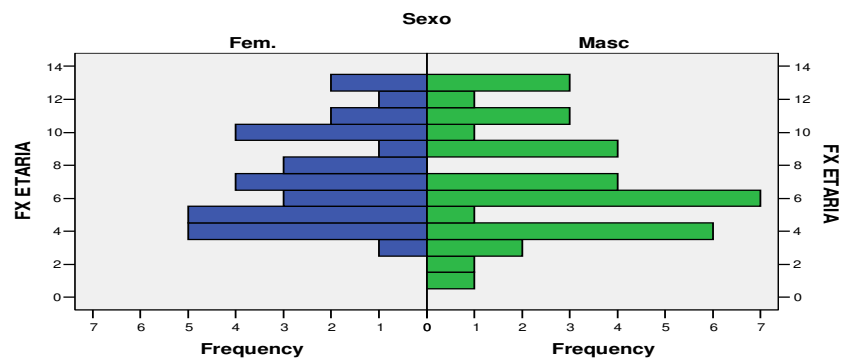


Gráfico 4: Pirâmide etária, subdividida por sexo, na amostra de pacientes com tuberculose na cidade de Porto Velho (RO). Faixa etária (Fx) 0: indivíduos com idade inferior a 5 anos. (Fx) 1: idade entre 5 e 10 anos; (Fx) 2: idade entre 11 e 15 anos; (Fx) 3: idade entre 16 e 20 anos; (Fx) 4: idade entre 21 e 25 anos; (Fx) 5: idade entre 26 e 30 anos; (Fx) 6: idade entre 31 e 35 anos; (Fx) 7: idade entre 36 e 40 anos; (Fx) 8: idade entre 41 e 45 anos; (Fx) 9: idade entre 46 e 50 anos; (Fx) 10: idade entre 51 e 55 anos; (Fx) 11: idade entre 56 e 60 anos; (Fx) 12: idade entre 61 e 65 anos; (Fx) 13: idade acima de 65 anos.

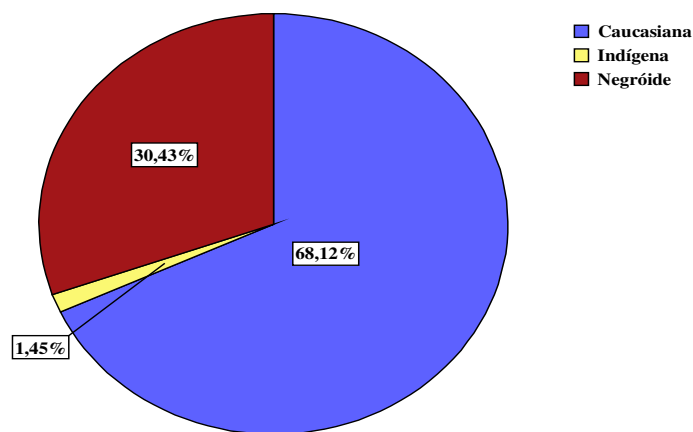


Gráfico 5: Etnia declarada pelos pacientes com tuberculose em uma amostragem realizada na cidade de Porto Velho (RO).

Escolaridade dos pacientes voluntários

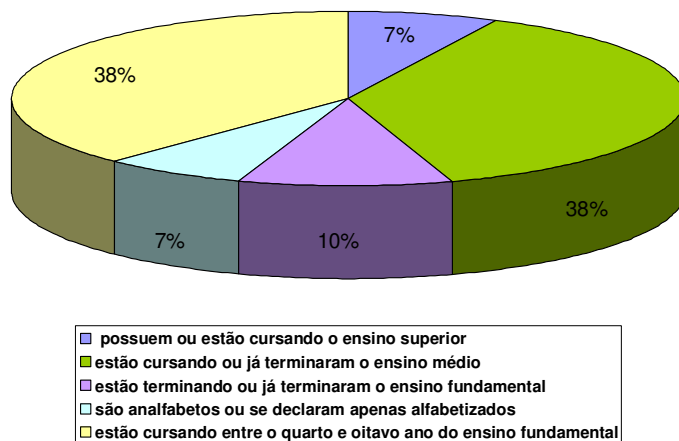


Gráfico 6: Demonstra um gráfico com a relação da escolaridade dos pacientes TB positivos, participantes na etapa da coletas de material biológico, e consequente preenchimento de questionário.

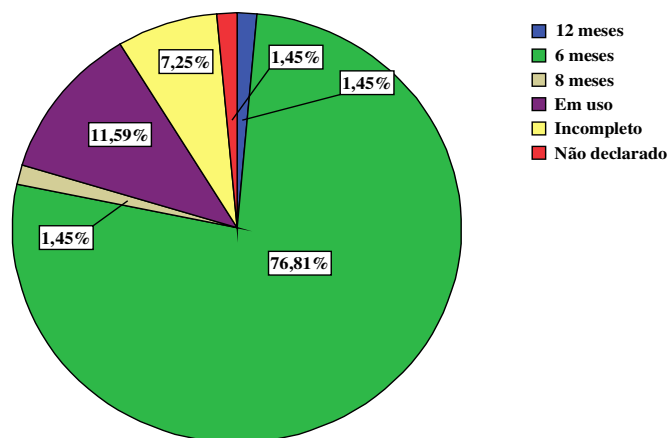


Gráfico 7: Tempo de uso de medicamentos durante o tratamento de Tuberculose, em uma amostragem realizada em Porto Velho (RO).

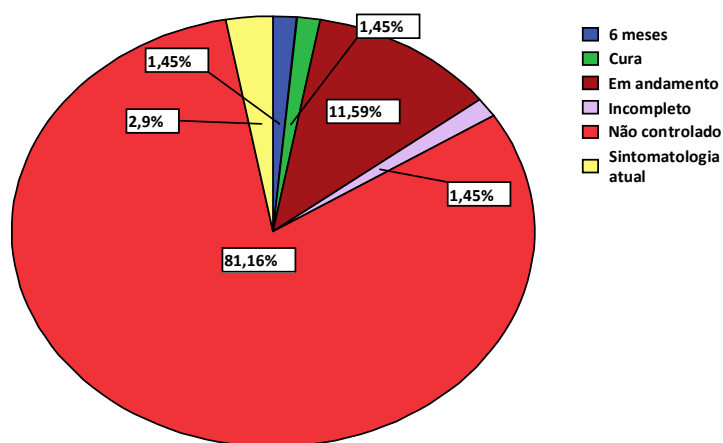


Gráfico 8 : Diagnóstico no tratamento final dos pacientes com tuberculose amostrados na cidade de Porto Velho (RO).

As frequências alélicas estimadas são apresentadas na (TABELA 3), sendo **possível analisar as frequências dos genótipos encontrados em amostras dos pacientes TB positivos, voluntários.**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências observadas e as esperadas segundo a Lei de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,2072$; $dp = 0,0059$).

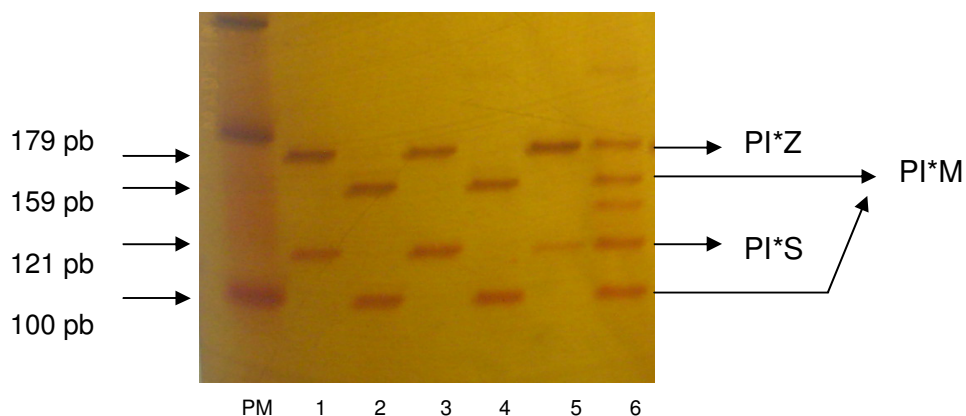


Figura 6: Gel de poliacrilamida 6% in natura corado com nitrato de prata, visualizando na primeira canaleta os pesos moleculares/pares de base (PM). Exibindo produto de amplificação específica para regiões dos alelos PI*S e PI*Z, de três amostras, sendo iniciado com amostras sem digestão (1, 3 e 5), seguidas de seus respectivos fragmentos após digestão enzimática com enzima de restrição *Taq I* (2, 4 = PI*M e, 6 = PI*SZ).

Tabela 3: Apresentação das frequências alélicas estimadas dos genótipos de alfa-1-antitripsina em uma amostra de pacientes com Tuberculose, município de Porto Velho (RO).

ALELOS	N	FREQÜÊNCIA
PI*M	124	0,9394
PI*S	5	0,0379
PI*Z	3	0,0227
Total	132	-----

Quando analisamos o risco relativo de desenvolver TB entre os pacientes e indivíduos da população de Porto Velho, comparando a presença do genótipo normal PI*MM os genótipos deficientes PI*MS, PI*MZ ou PI*SZ, encontramos um risco relativo (R) de 1,51 (p=0,448).

Considerando o baixo número amostral da amostra utilizada para comparação com a de pacientes com TB, optou-se por agrupar as amostras analisadas por Andrade (2003) e Assunção-Silva (2009), uma vez que as mesmas não apresentaram frequências alélicas estatisticamente discrepantes (TABELA 4).

Tabela 4: Frequências gênicas para o sistema PI na população geral* e em pacientes com TB pulmonar do município de Porto Velho (RO)

População	Geral	Desvio padrão	Tuberculose	Desvio padrão
PI*M	0,9437	0,010608	0,938607	0,019018
PI*S	0,04811	0,009794	0,038485	0,017424
PI*Z	0,0082	0,004068	0,022908	0,013496

* agrupadas as populações analisadas no município de Porto Velho- RO (n=46) e no município de São Luis- MA (n=199) (Assunção-Silva, 2009; Andrade, 2003).

7. DISCUSSÃO

7.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS BÁSICOS

Durante a fase de coleta de dados dos pacientes nas UBS foram identificadas falhas nos registros desta doença, sendo observados prontuários incompletos com ausência de informações pessoais, resultados de exames básicos de TB, teste de HIV, bem como as informações clínicas do quadro atual do paciente. Segundo relatos da enfermagem, as informações obtidas no Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN), apenas demonstram que os pacientes terminaram o período estipulado para a entrega mensal de remédios, não especificando a cura ou o abandono.

As observações descritas indicam que através desta falta de informações contidas nos prontuários, abre-se uma lacuna referente à confiabilidade dos dados, gerando graves problemas e inúmeros questionamentos, como o real diagnóstico do tipo de TB, uso correto do medicamento pelos pacientes, entre outros já citados. Faz-se importante uma maior atenção sobre os critérios e a precisão dos dados a serem informados (COSTA *et al*, 2000).

Neste trabalho verificou-se que, apesar da população estudada ter condições básicas de habitação, saneamento, e acesso aos programas de saúde medianamente favoráveis, e se tratar de pessoas com certo grau de escolaridade (ensino fundamental na grande maioria), são ainda considerados como pertencentes aos grupos de classe social menos privilegiada e, já demonstrados na literatura, ligados a infecção de várias doenças. Essas discussões trazem a tona, dentre as várias problematizações que acercam a doença, o fator estigmatizado de que a tuberculose está ligada a razões sócio-econômicas, e que nos países menos favorecidos, esta se torna ícone agravante e ou determinante para a exposição de contrastes intrínsecos dos altos índices de pobreza e a associação do desenvolvimento da TB (ESCOBAR *et al*, 2004, SANTOS *et al*, 2007).

Em relação ao tempo de tratamento a maioria dos pacientes relata terem se submetido a um tratamento de 6 meses, ou seja, o tempo mínimo estipulado pelo Ministério da Saúde (2002), já mencionadas anteriormente em descrições de tratamento.

Quando verificamos o diagnóstico final obtido nos prontuários dos pacientes voluntários, 81,16 % não tiveram seguimento nas Unidades Básicas, sendo que a alta recebida era mais devida ao término da entrega dos medicamentos do que propriamente a cura, pois não foram realizados testes, consulta final ou acompanhamento pelos agentes de saúde. Estes

dados foram definidos com a conclusão final da leitura dos prontuários, e corroborado no momento da entrevista com os pacientes, onde muitos confirmaram as questões acima, e até mesmo que acabaram abandonando o tratamento, voltando à procura deste, apenas após o ressurgimento da doença e agravamento dos sintomas, ou até mesmo contaminação de pessoas próximas. Também, subdividimos os pacientes voluntários, em três grupos, pelo tipo de ocupação, de acordo com a possibilidade de travar contato com pessoas, ou seja, grupo 1, indivíduos que possuem, pela sua ocupação, menor possibilidade de contato com outras pessoas (ex. do lar, aposentados, etc.); grupo 2, indivíduos cuja ocupação possibilita um contato razoável com outras pessoas (ex. mecânico, pedreiros, etc.); grupo 3, indivíduos cuja ocupação possibilita o contato com um grande número de pessoas (profissionais da área de saúde, estudantes, cabeleireiras, etc.). A maioria dos indivíduos possui atividade profissional classificada como grupo 3 (48,5%), seguindo-se pelo grupo 1 (33,8%) e grupo 2 (17,6%).

Nestes parâmetros pré-estabelecidos, objetivamos demonstrar a corroboração de alguns trabalhos, que já propuseram estudos de avaliação de contaminação do bacilo, entre pessoas, simplesmente pelo convívio e/ou contato direto, destacando o risco de infecção tuberculosa da população.

Um destes trabalhos se deu através de inquérito tuberculínico de profissionais de saúde (351 profissionais) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Obteve-se uma taxa (sendo esta maior) de conversão tuberculínica de 8%, onde, na área médica ressaltaram-se 15%, enfermeiros 13%, e em profissionais que ocupavam cargos administrativos do hospital 9% (KRITSKI *et al*, 2000). Outros trabalhos também foram feitos em diversas partes do mundo, como na Tailândia (DO AN, *et al*, 1999), Filipinas (TUPASI, *et al*, 2000), Canadá (MENZIES *et al*, 2000), enfatizando estes estudos, suas diretrizes e problematizações relacionadas. Nossos resultados, entretanto, não se apresentaram estatisticamente significantes.

7.2 ANÁLISE GENÉTICA

No Brasil, praticamente não se tem dados sobre a frequência das mutações PI*S e PI*Z, bem como das análises quantitativas da alfa-1-antitripsina na população geral (SERRA *et al*, 2008), pelas raras publicações a respeito nesta população, estima-se que, em populações gerais, a frequência para os heterozigotos PI*MS e PI*MZ, é de 9,2% e 5,5% respectivamente (FARIA *et al*, 2005). Em nossa amostra populacional encontramos uma ocorrência de valores levemente inferiores aos estimados.

Já na amostra da população geral dos indivíduos moradores de Porto Velho (ASSUNÇÃO-SILVA, 2009) foram descritos, por PCR, seis heterozigotos PI*MS (13%), e um heterozigoto PI*MZ (2,2%), determinantes de uma frequência gênica de, respectivamente, 0,065 e 0,01 para os alelos PI*S e PI*Z. Quando comparamos a amostra coletada de pacientes com TB com aquela da população residente em Porto Velho (RO), não encontramos diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($p=0,56$).

Andrade (2003), analisando, também por PCR, uma população do Maranhão, região Nordeste brasileira, encontrou valores de 0,043 e 0,007, respectivamente, para os alelos PI*S e PI*Z. Pagotto (1993), utilizando a técnica de focalização isoelétrica, estudou uma amostra de pacientes que procuraram o serviço de investigação de paternidade do Hospital da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SP), relatando frequências de PI*S = 0,05 e PI*Z = 0,03. As frequências obtidas no presente trabalho também não diferem muito das relatadas por esses autores.

Considerando o n amostral analisado por Assunção-Silva (2009) e que este utilizou em suas análises a mesma técnica que Andrade (2003), após testar a heterogeneidade entre as duas amostras, estas foram agrupadas e comparadas suas frequências gênicas com as obtidas na amostra de pacientes (TABELA 4), não sendo observados desvios significantes. Neste sentido, quando calculado o poder do teste *a posteriori*, para os dados aqui apresentados, constatamos que em se testando uma hipótese H_1 : PI não MM controle < PI não MM teste, para um $\alpha = 0,05$, PI não MM controle = 0,11 e 0,12 para a população teste, o poder do teste encontrado é de 0,047. Se, aumentarmos $\alpha = 0,30$, considerando os dados iniciais como dados piloto LENTH (2006-9), o poder do teste também incrementa para aproximadamente 30%, com o mesmo tamanho amostral.

A análise do risco relativo de desenvolver TB entre os pacientes e indivíduos da população de Porto Velho, comparando a presença do genótipo normal PI*MM os genótipos deficientes PI*MS, PI*MZ ou PI*SZ, demonstra a existência de um risco relativo (R) de 1,51. Entretanto, embora o R seja sugestivo de que ser homozigoto para o alelo PI*M aumente em 51% o risco de contrair e desenvolver TB, tal resultado não é estatisticamente significativo ($p=0,448$), indicando que, na realidade uma maior amostragem se faz necessário para poder se concluir a tal respeito.

Apesar dos testes estatísticos apontarem para a necessidade de um grande incremento na amostragem, são também fortes as razões biológicas para acreditar-se que a existência de

variantes condicionadoras de diminuição plasmática de A1AT possam predispor o organismo humano a desenvolver TB, como por exemplo a relação direta existente na síntese da proteína alvo de nosso estudo e IL-6 (BARKER *et al*, 1997), sendo que a última faz parte da lista de genes candidatos para predisposição a doença (ARMSTRONG, 1971); achados biológicos indicando esta protease de serina como fator de proteção contra infecção por *M. abscessus* (CHAN *et al*, 2007); a ligação direta da proteína nas vias de oxi-redução pela inibição da EM (BIETH, 1986), entre outras. Desta forma, destacamos a necessidade de lançar mão de técnicas moleculares mais avançadas, tais como estudo de expressão gênica, para a continuidade da busca da relação da atividade enzimática da proteína do sistema PI com doenças infecciosas, principalmente a tuberculose.

8. CONCLUSÕES

Através do levantamento de dados nos prontuários de pacientes diagnosticados com tuberculose no município de Porto Velho, nos anos de 2007 e 2008, é possível verificar que apesar de sua importância, e configuração de ainda ser tratada como um sério problema de saúde pública, a doença em si, seu acompanhamento junto aos pacientes seguidos do tratamento, sofrem uma deficiência de integração, sendo enfatizada pela discordância entre as informações contidas em alguns prontuários, bem como a falta de controle lançada nas diretrizes dos programas de TB, vinculadas às UBS estudadas.

Apesar dos diversos estudos, em todo o mundo, que integram a associação dos fenótipos da alfa-1-antitripsina com diversas doenças, principalmente as pulmonares como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), Asma e outras correlatas, não se tem registros de dados de frequências do sistema PI, nem de sua associação com a TB, sendo o presente trabalho pioneiro na questão.

Quanto da análise genética dos pacientes diagnosticados como TB pulmonar positivos no município de Porto Velho, nesta amostra não foi possível concluir quanto associação da presença de determinado alelo do sistema PI com a predisposição de desenvolver a patologia em questão. Destacamos a importância de estudos mais amplos que determinem a frequência das principais mutações associadas à DA1AT, principalmente relacionada à tuberculose.

Para que as análises de associação possam ser continuadas, métodos moleculares e de bioinformática avançada devem ser incorporados a pesquisas futuras, de modo a minimizar a necessidade de aumentar o número amostral.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, P.; *et al.*; **Qual o significado das medidas epidemiológicas taxa de prevalência, taxa de incidência cumulativa e taxa de incidência em unidades pessoa/tempo?** Eurotrials Scientific Consultants - Ficha Formativa de Estatística, nº 10, Dez/2007.

ASSUNÇÃO-SILVA, A. C.; **Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica associada à Deficiência de Alfa-1-Antitripsina.** Monografia de graduação em Ciências Biológicas. Fundação Universidade Federal de Rondônia, 2009.

ALJANABI SM & MARTINEZ.; **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques.** Nucleic Acids Res. 25(22):4692-3, 1997.

AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS. **European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency.** Amj Respir. Crit. Care Med. Vol. 168 (7):818-900, 2003.

AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS, Amj Respir. Crit. Care Med. Vol. 168, Pg. 823-855, 2006.

ANDRADE, M. S.; **Frequência das mutações mais comuns (S e Z) no gene para a deficiência da alfa-1-antitripsina em doadores de sangue do hemocentro do Maranhão.** Dissertação de Mestrado. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE – UFMA/2003.

ARANAZ A.; LIÉBANA E.; GÓMEZ-MAMAPASO E.; *et al.* ***Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* subsp. Nov: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain.** Int J Syst Bacteriol, 49(Pt3):1263-73, 1999.

ARMSTRONG, J.A., HART, P. D.; **Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on the fusion of lysosomes with phagosomes.** J. Exp. Med. 134, 713-740, 1971.

BARNES, P.F.; BLOCH, A. B.; *et.al.*; **Tuberculosis in patients with HIV infection.** N Eng J Med., 324:1644-50, 1991.

BARREIRA, D.; GRANGEIRO, A.; **Avaliação das Estratégias de controle da tuberculose no Brasil.** Revista Saúde Pública; 41(1), 2007.

BARKER, A; BRANTLY, M.; CAMPBELL, E., *et al.* **Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting.** Bull World Health Organ; 75(5):397-415, 1997.

BELLAMY, R., *et.al.*; **Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis.** Tubercle and Lung Disease.; 79(2): 83–89, 1998b.

BIETH, J. C.; **Elastases: catalitic and biologic properties.** In: MECHAM, R. (Ed) Region of matrix accumulation. New York: Academic Press, New York, p.217-320, 1986.

BILLINGSLEY, G. D.; *et al .;* **Physicak mapping of four serpin genes: alpha-1-antitrypsin, alpha-1-antiquimiotrypsin, corticosteroid binding globulin and protein C inhibitor, within a 280 Kb region on chromossome 14q 32.1.** Am J Hum Genet, 52:343,1993.

BOMBARDA, S.; *et al .;* **Imagem em Tuberculose Pulmonar.** Jornal de Pneumologia 27(6), nov-dez de 2001.

BORGES, M., *et.al.;* **Molecular Analisis of *Mycobacterium tuberculosis* strain from an outpatient clinic in Porto Alegre, (RS).** J. Bras. Pneumol.; 30 (4) 448-54, 2004.

BRAGA, J.U.; BARRETO, A.M.; HIJJAR, M.A. **Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose.** Relatório final. Rio de Janeiro: CRPHF/FUNASA; 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de normas para o controle da tuberculose.** Brasília, 4a ed. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino serviço.** 5ª ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

CABELLO.; P. H. & KRIEGER., H.; **Genioc: Sistema para análises de dados de genética.** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 1987.

CABRERA, M., *et al.* **Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis.** J Exp Med.; 182:1259-64, 1995.

CAMELIER, A. A.; *et al .;* **Alpha-1- antitrypsin: Diagnosis and treatment.** Jornal Brasileiro de Pneumologia; 34(7):514-527, 2008.

CAPELLOZI, V. L.; **Tuberculose.** Guanabara Koogan: 6ª ed. Rio de Janeiro; 320-322, 2000.

CARLSON, J.A.; *et al .;* **Accumulation of PI Z antitrypsin causes liver damage in trangenic mice.** J Clin Invest, 83:1183-90, 1989.

CHAN, E. D.; *et al.;* **Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 39: 690- 696; 2007.

COHEN, C.; *et al .;* **Deficiência da Alfa-1-antitripsina.** Boletim de Pneumologia Paulista, Ano 19, nº 27, 10-13, 2005.

COLE, S.T.; *et al* . **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** Nature, 393:537-44, 1998.

COOPER, A.M.D.K., *et al*. **Disseminated Tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice.** J Exp Med.; 178:2243, 1993.

COSTA, L; *et al*.; **Tuberculose: análise das variáveis relacionadas ao abandono de tratamento, no município de São José do Rio Preto –SP no ano de 2000.** HB Científica, 9 (2), 2000.

COX, D. W.; *et al* .; **DNA restriction fragments associated with alpha-1-antitrypsin indicate a single origin of deficiency allele PI Z.** Nature 316:79, 1985.

COX, D. W.; **Alfa-1-antitrypsin deficiency. The metabolic basis of Inherited Disease.** 6th Mc Graw-Hill Book Co. New York, 2409-2437, 1989.

COX, D. W.; e Col.; **Alpha-1-antitrypsin deficiency. The Metabolic Basis of Inherited Disease.** New York: Mc Graw-Hill Book Co., p.4125-58, 1994.

CRYSTAL, R. G.; *et al* .; **The alpha-1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy.** Chest; 95(1):196-208, 1989.

CRYSTAL, R. G.; *et al* .; **Biologic basis of pulmonary fibrosis.** The Lung: Scientific foundation. First Edition Raven Press. New York, PP 2031-2146, 1991.

CURIEL, D.; *et al* .; **Alpha-1-antitrypsin deficiency caused by the alpha-1-antitrypsin Nullmattawa gene. Na insertion mutation rendering the alpha-1-antitrypsin gene incapable of producing alpha-1-antitrypsin.** J Clin Invest, 83:1144, 1989.

DANIEL, T.M.; **The history of tuberculosis.** Respir Med; 100: 1862-70; 2006.

DEMEO, D. L.; SILVERMAN, E. K.; **Alpha-1-antitrypsin deficiency: genetic aspects of alpha-1-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk.** Thorax; 59 (3):259-64, 2004.

de SERRES, F. J.; **Worldwide racial and ethnic distribution of alpha-1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys.** Chest; 122(5): 1818-29, 2002.

DO AN, L. K.; *et al*.; **Increased risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection related to the occupational exposures of health care workers in Chiang Rai, Thailand.** Int J Tuberc Lung Dis. 3(5):377-81; 1999.

DUNLAP, N. E.; *et al* .; **Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and childrens.** Am J Respir Crit Care Med; 161:1376-1395, 2000.

ESCOBAR, A.L., COIMBRA, C., CAMACHO, L., et.al. **Tuberculose em populações Indígenas de Rondônia, Amazônia, Brasil.** Cad. Saúde Pública, 17(2):285-298, Rio de Janeiro, 2001.

ESCOBAR, A.L.; *et al.*; **Aspectos Epidemiológicos da Tuberculose na População Indígena Suruí, Amazônia, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37 (4), p.338-342, 2004.

FARIA, E. J.; *et al.* ; **Association between alpha 1 antitrypsin deficiency and cystic fibrosis severity.** Jornal de Pediatria (Rio- RJ); 81 (6): 485-90, 2005.

FILHO, A. C.; *et al.* ; **Diretrizes Brasileiras para a Tuberculose.** Jornal Brasileiro de Pneumologia 30:Supl. 1, 2004.

FLESH, L., KAUFMANN, S.H.; **Mycobacterium growth inhibition by interferon-gama-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strain of Mycobacterium tuberculosis.** J Immunol.; 138:4408, 1987.

FONSECA-PEREZ, T.; GONZALES-COIRA, M.; ARIAS, S.; **PI locus (α 1AT) allele frequentes in Andean Venezuelan population.** Gene Geograf.; 10(2):65-72, 1996.

FRANTS, R. R.; ERIKSSON, A. W.; **Reliable Classification of six PIM subtypes by separator isoelectric focusing.** Institute of Human Genetics; Free University, Amsterdam, 1978.

FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.R.; MUNSIFF, S.S.; *et al.* ; . **Tuberculosis.** Lancet; 362(9387): 887-99; 2003.

GLYNN, J.R.; *et al.* ; **Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review.** Emerg Infect Dis.;8(8):843-9. 2002.

GRANG, JM.; *et al.*; **A study of acute-phase reactant proteins in Indonesian patients with pulmonary tuberculosis.** Tubercle; 65(1):23-39, Mar. 1984.

Histórico da Tuberculose. Disponível em: <http://www.saudevidaonline.com.br>. Acesso em Janeiro de 2008.

HOLFORD T. R.; **Statistical Methods in Medical Research;** 9: 525, 2000.

HUBBER, R.; CARREL, R. W.; **Implication of the three dimensional structure of Alpha-1-antitrypsin for structure and function of serpin.** Biochemistry 28:8953-8966, 1989.

HUTCHISON, D. C.; *et al.* ; **Alpha-1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z.** Respir Med; 92(3):367-77, 1998.

IANNUZZI, MC.; MALIARIK, M.; RYBICKI, B. **Genetic polymorphisms in lung disease: bandwagon or breakthrough.** Respir Res.; 3:15. Epub, 2002.

- KALUZA, W., *et al.* **Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- 238A promoter polymorphism.** J Invest Dermatol.; 114:1180-3, 2000.
- KLASEW, E. D.; *et al.* ; **PI (alpha-1-antitrypsin) subtypes: frequency of PI M4 in several populations.** Hum Genet, 62:139, 1982.
- KRITSKI. A.; *et al.*; **Tuberculose do ambulatório à enfermagem.** São Paulo: Atheneu: 7-20; 2ª ed., 2000.
- KUBBA, A. K.; YOUNG, M.; **The long suffering of Frederic Chopin.** Chest; 113:210-6, 1997.
- KUEPPERS F, CHRISTOPHERSON MJ. **Alpha1-antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing.** Am J Hum Genet. 1978 Jul;30(4):359-65.
- KUZEMKO, J. A.; **Chopin's illnesses.** J R Soc Med.;87(12):769-72, 1994.
- LALANI, A. S., *et al.*; **Use of chemokine receptors by poxviruses.** Science. 286: 1968-1971, 1999.
- LAPA E SILVA, J.R.;BOÉCHAT, N. **The Ressurgence of Tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis.** Jornal Brasileiro de Pneumologia 30(4), 2004.
- LAURELL, C. B.; ERIKSSON, S.; **The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency.** Scand J Clin Lab Invest; 15:132-49, 1963.
- LEE. J. H.; BRANTLY, M.; **Molecular mechanisms of alpha-1-antitrypsin null alleles.** Respiratory Medicine, 94 (suppl. C):S7-S11, 2000.
- LENTH, R. V.; **Java Applets for Power and Sample Size [Computer software].** Acesso em 22 de março de 2010, de <http://www.stat.uiowa.edu>. 2006.
- LOEBERMANN, H.; *et al.* ; **Human alpha-1 proteinase crystal structure analyses of two crystal modifications: molecular model and preliminary analysis of the implications for function.** J Mol Biol, 117:531-56, 1984.
- LOMAS, D. A.; PARFREY, H.; **Deficiência da Alfa-1-antitripsina: Fisiopatologia Molecular.** Thorax; 59:529-535, 2004.
- LUCOTTE, G.; SESBOÛÉ, R.; **Polymerase chain reaction detection of S and Z alpha-1-antitrypsin variants by duplex PCR assay.** Molecular and Cellular Probes: 13, 389-391, 1999.
- LUISETTI, M.; SEERSHOLM, N.; **Deficiência da Alfa-1-antitripsina: Epidemiologia da Alfa-1-antitripsina.** Thorax; 59:164-169, 2004.

MAEDA, H.; *et.al.*; **TGF- β enhances macrophages ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice.** J Immunol; 155(10):4926-32, 1995.

MCGUIRE, W., *et.al.*; **Variation in the TNF alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.** Nature.;371:508-10, 1994.

NORTH, R.J., MEDINA, E.; **Who important is Nrampl in tuberculosis?** Trends Microbiol.; 6:441, 1998.

MAGNO, J. S. **Métodos de Extração de DNA genômico a partir de sangue total para amplificação pela técnica da PCR.** Monografia de graduação. Porto Velho, Universidade Federal de Rondônia. 2008.

MENZIES, D.; *et al.*; **Hospital ventilation and risk for tuberculous infection in canadian health workers.** Ann Intern Med., 133(10):779-89; 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE.; **Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica.** Fundação Nacional da Saúde/Comitê Técnico - Científico de Assessoramento à Tuberculose/Comitê Assessor para co-infecção HIV- Tuberculose. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE.; **Situação da Tuberculose no Brasil.** Programa Nacional de controle da Tuberculose. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008.

NETO, L. E. S. M.; *et al .*; **Pulmonary aspects in alpha-1-antitrypsin deficiency.** Revista Portuguesa de Pneumologia, vol.X (2):145-154, 2004.

NORTH, R.J., MEDINA, E.; **Who important is Nrampl in tuberculosis?** Trends Microbiol.; 6:441, 1998.

NORTH, R.J.; JUNG, Y.J.; **Immunity to Tuberculosis.** Annu Rev Immunol, (22):599-623, 2004.

NUKIWA, T.; e col.; Characterization of the M1(Ala²¹³) type of **alpha-1-antitrypsin, a newly recognized common normal alpha-1-antitrypsin haplotype.** Biochemistry 26: 5259,1987.

OLIVEIRA, M. M., *et.al.*; **Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF- α (-238/-308) gene among TB and nom TB patients: Susceptibility markers of TB occurrence?.** J Bras Pneumol.; 30(4) 461-7, 2004.

PAGOTTO, R. C.; **Polimorfismo da Alpha-1-antitripsina humana em populações brasileiras.** Dissertação do Mestrado. Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo, 1993.

PELCZAR Jr., Michael Joseph.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, Noel R.; EDWARDS, Diane D.; PELCZAR, Merna.; **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**, vol. II, 2. ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996.

PEM, F.; **Immunities in and to tuberculosis: implications for pathogenesis and vaccination, in tuberculosis, back to the future.** New York: J Porter; 2000.

PERESI, E.; *et.al.*; **Citocinas e proteínas de fase aguda do soro como marcadores de regressão da resposta inflamatória ao tratamento da tuberculose pulmonar.** Jornal Brasileiro de Pneumologia; 34(11):942-949, 2008.

RAJA, A.; **Immunology of tuberculosis.** Indian J Med Res., 120(4):213-32, 2004.

RAYMOND, M. & ROUSSET, F.: GENEPOP ON THE WEB.V.4.0.10. Disponível em: <http://www.biomed.curtin.edu/>> acesso em 20 de fevereiro de 2010.

ROSEMBERG, J.; **Tuberculose. Panorama Global. Óbices para seu controle.** 2nd Ed. Fortaleza: Secretaria do Estado da Saúde do Ceará, 1999.

ROSEMBERG, J.; **Mecanismos Imunitário da Tuberculose – Síntese e Atualização.** Boletim de Pneumologia Sanitária, vol. 9, nº 1, jan. /jun – 2001.

ROSSI, D., ZLOTNIK, A.; **The biology of chemokines and their receptors.** Annu. Rev. Immunol. 18: 217-242, 2000.

ROY, S., *et al.* **Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy.** J Infect Dis.; 176:530-2, 1997.

RODRIGUES, L., BARRETO, M., KRAMER, M., *et.al.* **Resposta Brasileira à tuberculose: Contexto, desafios e perspectivas,** 2007.

RUFINO, R.; LAPA, J. R.SILVA.; **Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. 32(3):241-8;2006.

SANDHAUS, R. A.; **Alpha-1-antitrypsin deficiency. New and emerging treatments for alpha-1-antitrypsin deficiency .** Thorax; 59:904-909, 2004.

SANTOS, M. L. S. G.; *et al.*; **Pobreza: caracterização socioeconômica da tuberculose.** Revista Latino-Americana de Enfermagem, nº 15, 2007.

SEIXAS, S. G.; *et al .*; **Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alfa-1-antitrypsin polymorfism.** Hum Genet; 108(1)20-30, 2001.

SEPKOWITZ, K.A, *et.al.*; **Tuberculosis in the AIDS era.** Clin Microbiol.; 8:180-99, 1995.

SERRA, H. G.; *et al .*; **Avaliação da Concentração de Alfa-1-Antitripsina e da presença de alelos S e Z em uma população de sintomáticos respiratórios crônicos.** J Bras Pneumol; 34(12):1019-1025, 2008.

SERRA, S.; BANHA, G.; **Alpha-1-antitrypsin deficiency: Two cases report.** Revista Portuguesa de Pneumologia, Vol. XIV, nº 2, 2008.

SILVA, E.; *et al.*; **Deficiência da Alfa-1-antitripsina, causa rara da cirrose hepática no adulto.** Medicina Interna Vol. 8, nº 4. Hospital Curry Cabral-Lisboa, 2001.

SILVA, J. R. L.; BOÉCHAT, N.; **The resurgence of tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis.** Jornal Brasileiro de Pneumologia 30(4) - Jul/Ago de 2004.

SIQUEIRA, H. R.; *et al.*; **Clinical evolution of a group of patients with multidrug-resistant TB treated at a referral center in the city of Rio de Janeiro, Brazil.** Jornal Brasileiro de Pneumologia.; 35(1):54-62, 2009.

SMALL, P. M., *et al.*; **The epidemiology of tuberculosis in San Francisco; A population-based study using conventional and molecular methods.** N Engl J Méd.; 330:1703-9, 1994
appud BORGES, M., *et.al.*; **Molecular Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain from an outpatient clinic in Porto Alegre, (RS).** J. Bras. Pneumol.; 30 (4) 448-54, 2004.

STEAD, W.W., **Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics?.** INT J TUBERC LUNG DIS., 5(9):807–814, 2001.

STOCKLEY, R.A., NEEDHAM, M., **Deficiência da Alfa-1-antitripsina: Manifestações Clínicas e História Natural,** 2004.

STROHL, A.W., ROUSE, H., FISHER, D.B., **Microbiologia Ilustrada – Artmed Editora,** 259-272, 2004.

SVEGER, T.; **Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200.000 infants.** N. Engl J Med 294:1316-1321, 1976.

TAKAHASHI, H.; CRYSTAL, R. G - **Alfa-1-antitripsina null (isola di procida): an alpha-1-antitripsina deficiency allele caused by deletion of all alfa-1-antitripsina coding exons.** Am J Hum Genet, 47:403, 1990

TEIXEIRA, H. C.; *et al.*; **Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for succes.** Jornal Brasileiro de Pneumologia; 33(3):323-334, 2007.

TETE-BENESSIAN. A.; GBEASSOR, M.; **Alpha-1-antitrypsin phenotypes in togolese population: Description of high frequency of rare allele Pi(F) in isolated ethnic group.** Pathol Biol; 2009.

TRABULSI, Luiz Rachid.; ALTERTHUM, Flavio.; GOMPERTZ, Olga Fischman.; CANDEIAS, José Alberto Neves.; *et al.*; **Microbiologia,** 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

TUPASI, T. E.; *et al.*; **BCG coverage and the annual risk of tuberculosis infection over a 14-year period in the Philippines assessed from the Nationwide Prevalence Surveys.** Int J Tuberc Lung Dis., Mar 4; (3):216-22; 2000.

VIDAL, R.; *et al.*; **Committee on the National Registry of individuals with Alpha-1-antitrypsin deficiency.** Arch Bronconeumol; 42(12):645-659, 2006.

VENDRAMINI, S. H. F.; *et al.*; **Tuberculose no idoso: análise do conceito.** Revista Latino-Americana em Enfermagem, jan-fev; 11(1):96-103, 2003.

YANG, P.; *et al.*; **Alpha1-Antitrypsin Deficiency Allele Carriers among Lung Cancer Patients.** Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention vol 8: 461–465, 1999.

WEIDINGER S, SCHWARZFISCHER F, CLEVE H. **Pi subtyping by isoelectric focusing: further genetic studies and application to paternity examinations.** Z Rechtsmed.;86(1):1-7. 1980.

WILSON, A.G., *et al.*; **Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor (TNF) alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product.** Hum Mol Genet.;1:353, 1992.

WONG & SAHA. **Serum immunoglobulin and acute phase protein concentrations in pulmonary tuberculosis patients in Singapore.** Trop Geogr Med. 41(3):218-21, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **α -1-antitrypsin deficiency: Memorandum from WHO meeting.** Bulletin of the World Health Organization; 75(5):397-415, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO Report 2001.** Geneva: (WHO/CDS/TB. 287), 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing.** Geneva: World Health Organization; 2007

ANEXOS



Parte do Painei: “Tratamento da Tuberculose”;
Poty, óleo sobre madeira; 1957; 2,50mx10m;
Acervo do Centro de Referência Professor Hélio Fraga;
Rio de Janeiro - Brasil.

Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia

1- CARTA CONVITE AOS PACIENTES

Prezado Senhor (a):.....

Através da presente correspondência, informamos que Vossa Senhoria foi selecionado (a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa desenvolvido pelo Departamento de Genética da Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

Solicitamos seu comparecimento no dia das, e/ou no dia das,conforme sua preferência, na (unidade de saúde estabelecida), sito a, Bairro..... – Porto Velho/RO.

Salientamos que seu comparecimento é de fundamental importância para a realização da pesquisa e progresso científico.

Porto Velho de 2009

Dra. Rubiani de Cássia Pagotto
Profa.Depto. Biologia – NCT/UNIR
Pesquisadora Associada – CIBEBI/NUSAU/UNIR
Contato:2182-2224 – Horário Comercial

3 - QUESTIONÁRIO PARA PESQUISA DE ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM A TUBERCULOSE PULMONAR
DADOS PESSOAIS

- 1- Paciente nº: _____ Data: _____
- 2- Código do paciente: _____
- 3- Idade: _____ Sexo: () M () F
- 4- Etnia: () Caucasiano () Negro () Índio () Outros _____
- 5- Naturalidade: _____
- 6- Estado Civil: () casado(a) () solteiro(a) () divorciado(a) () viúvo(a)
- 7- Profissão: _____ Tempo: _____
- 8- Renda Familiar: _____
- 9- Escolaridade: _____
- 10- Endereço: _____
_____ Tel. Contato _____
- 11- Tipo de residência: _____
- 12- Saneamento: () Sim () Não
- 13- Nº de moradores na residência: _____
- 14- Doenças Familiares: () Sim () Não _____
- Grau de Parentesco _____

ANTECEDENTES DE TUBERCULOSE

- 15- Já teve quadro diagnosticado como tuberculose () não () sim, quanto tempo _____ Local de atendimento _____
Família?
- 16- Qual o medicamento que fez uso? _____
Dose: _____ tempo de uso: _____
- 17 – Qual grau de complexidade: () baixa () média () alta
- Obs: _____

QUADRO ATUAL

18- Há quantos dias iniciou o quadro atual?_____

19- Faz uso freqüente de algum medicamento?

☐ não ☐ sim Quais?_____

20- Fez uso de algum medicamento desde o início do quadro atual?

☐ não ☐ sim Quais? _____

21- Quadro clínico da tuberculose atual caracterizado como:

☐ baixa complexidade ☐ média complexidade ☐ alta complexidade

RESULTADOS DE EXAMES

22- Exame realizado_____ Data:_____

Resultado:_____

Obs: Da página 68 à 76, foram inseridos documentos scaneados em anexo na parte da encadernação final, por isso o lapso de numeração das páginas.

APÊNDICES



Parte do Painel: "Tratamento da Tuberculose";
Poty, óleo sobre madeira; 1957; 2,50mx10m;
Acervo do Centro de Referência Professor Hélio Fraga;
Rio de Janeiro - Brasil.

SOLUÇÕES E REAGENTES

EXTRAÇÃO DE DNA:

Tampão de Lise de Eritrócitos - Lise I

Tris/HCl pH 7.6	0.01M
Sacarose	0.32M
MgCl ₂	5mM
Triton X 100	1%

PROTEINASE K- 10mg/ml H₂O

SDS 20%

NaCl 5M

Tampão A

NaCl	0.4M
EDTA	2 mM
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
H ₂ O	qsp

TAMPÃO PARA RESSUPENSÃO DE DNA pH 8,0 - 1X - TE

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA

ELETROFORESE EM GEL:

TAMPÃO PARA CORRIDA EM ELETROFORESE/ TBE 10X, pH 8; 0,9 M

890 mM Tris
890 mM Ácido bórico
20 mM EDTA
pH 8,0

BROMETO DE ETÍDIO 10 mg/ml

Soluções e reagentes usados para eletroforese em gel de agarose (apenas quantificação)

- Tampão TBE 10X;
- Gel agarose 1% = 1g agarose + 100 ml de TAE ou TBE 1X;
- Brometo de Etídio.

Passos a seguir:

- Aquecer a agarose com água destilada em microondas por aproximadamente 3 minutos, ou até ficar translúcido;
- Levar à cuba para resfriar;
- Colocar o “pente”;
- Após o resfriamento e solidificação do gel, adicionar tampão TAE 1X (substituível por TEB) até que um filme cubra o gel constante na cuba;
- Adicionar cuidadosamente as amostras de DNA;
- Ajustar a fonte para 80 volts por 5 minutos;
- Após 5 minutos elevar a voltagem até a desejada, aguardar aproximadamente 15 minutos.
- Desligar a fonte, retirar o gel e levar para a solução de brometo de etídio, onde o gel permanecerá cerca de 30 minutos, após isto se leva ao transiluminador para visualização.

GEL DE POLIACRILAMIDA:

Concentração	Acril. + Bis [29:1] (ml)	Glicerol (ml)	H2O (ml)	TBE 10X (ml)	TEMED (μl)	Pers. De Potássio [650mg/6,5ml] (μl)
6%	2,000	0,700	6,195	1,000	7,5	150
	4,000	1,400	12,390	2,000	15	300
7%	2,333	0,700	5,862	1,000	7,5	150
	4,667	1,400	11,723	2,000	15	300
8%	2,667	0,700	5,528	1,000	7,5	150
	5,333	1,400	11,056	2,000	15	300

Obs.: Volume total:

10 ml

20 ml

PROCEDIMENTOS:

- Lavar as placas de vidro com detergente neutro e água destilada, e com etanol 70% a parte que entra em contato com o gel, coloca-se estas para a secagem.
- Após a secagem do álcool, estas devem ser montadas em forma de sanduíche. Em seguida, coloca-se os prendedores para evitar vazamento no momento de verter o gel.
- Após a preparação do gel de poliacrilamida, a mesma deve ser vertida cuidadosamente entre as placas para evitar a formação de bolhas, após isto o pente deverá ser inserido entre as placas.
- Quando polimerizado, cerca de 30 minutos, lava-se os poços do gel com seringa para retirada do acúmulo de gel, as placas serão montadas na cuba de eletroforese (Thermo EC 120), adicionado tampão TBE 5X.

CORANDO O GEL DE POLIACRIALMIDA

SOLUÇÃO FIXADORA (NaOH 0,56 M)

{ 22,5g de NaOH (P.M. 40);
1 litro de água destilada.

SOLUÇÃO REVELADORA

{ 833 ml de água destilada;
160 ml de álcool etílico (absoluto);
7 ml de ácido acético glacial.

SOLUÇÃO NITRATO DE PRATA 0,2%

{ 2g de nitrato de prata
1L de H₂O destilada

Após corrida eletroforética o gel é fixado em 100 ml de solução fixadora por 10 minutos. Passado o tempo de incubação acrescenta-se 2ml de solução de prata, em lenta agitação durante 20 minutos. Após a fixação, o gel foi lavado sob lenta agitação em água, durante 30 segundos, e em seguida, submetido à 100 ml de solução reveladora (Na₂CO₃) + 1 ml de formaldeído, sob agitação constante, até aparecerem as bandas. A reação foi bloqueada com 100 ml de solução fixadora.